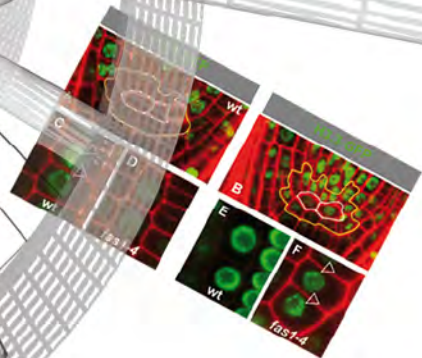
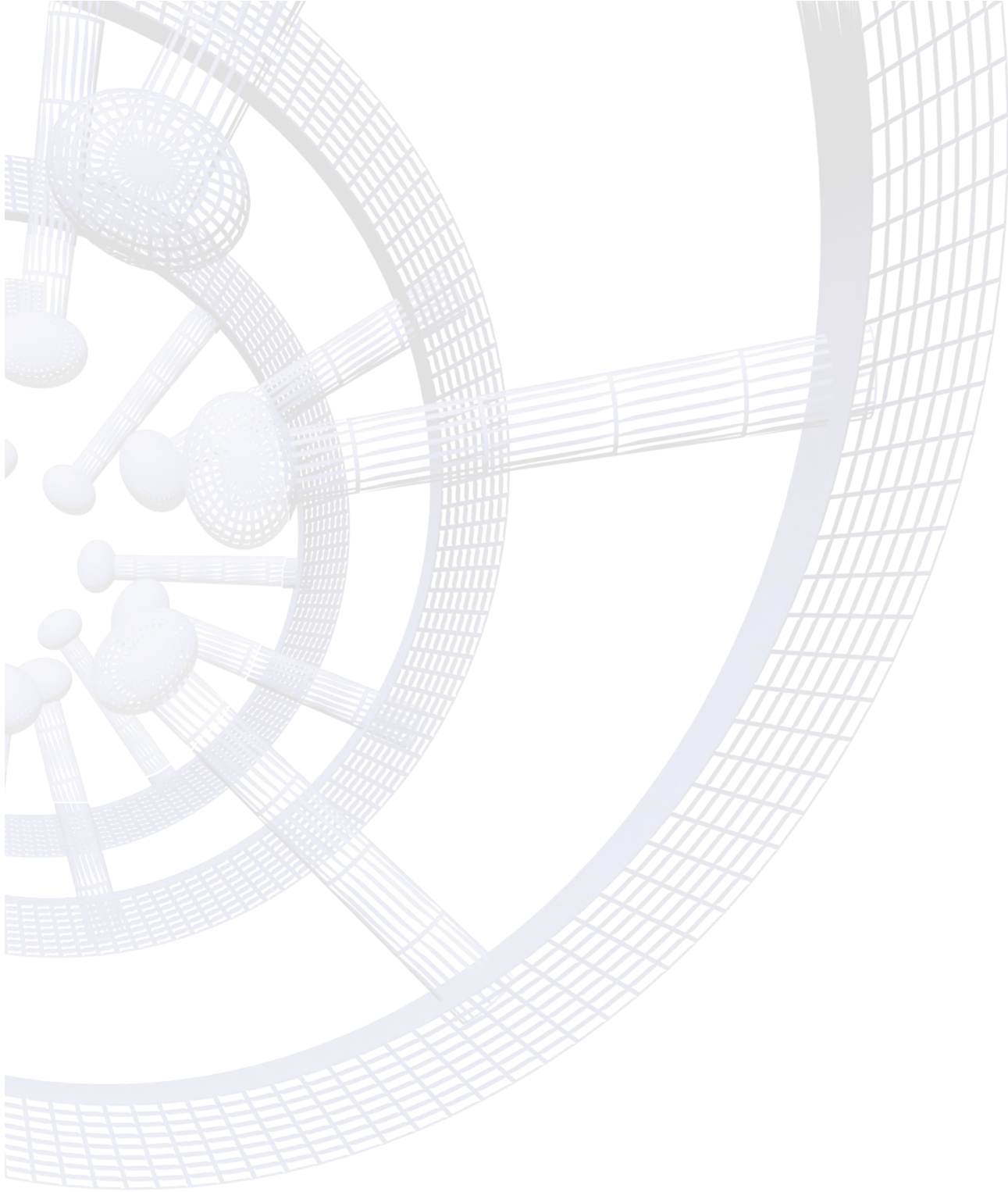




CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
SEVERO OCHOA





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

Índice / Index

6	Reflexiones del Director / Director's Remarks
8-15	El CBMSO en breve / The CBMSO in a nutshell
18	Transmisión de señales a través del receptor para el antígeno de células T <i>Signal transduction through the T cell antigen receptor</i> BALBINO ALARCÓN SÁNCHEZ
20	Biogénesis del cilio primario <i>Primary cilium formation</i> MIGUEL A. ALONSO LEBRERO
22	Glicogenómica Funcional <i>Functional Glycogenomics</i> PEDRO BONAY MIARONS
24	Interacciones funcionales entre la tetraspanina CD9 y moléculas de adhesión celular <i>Functional interactions between tetraspanins and cell adhesion molecules</i> CARLOS CABAÑAS GUTIÉRREZ
26	Fisiopatología mitocondrial <i>Mitochondrial pathophysiology</i> SUSANA CADENAS ÁLVAREZ
28	Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer <i>Cellular Plasticity in Development and Cancer</i> CÉSAR COBALEDA HERNÁNDEZ
30	Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática <i>Cytoskeleton-plasma membrane interactions</i> ISABEL CORREAS HORNERO
32	Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología <i>Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology</i> JOSÉ M. CUEZVA
34	Inmunología Viral <i>Viral Immunology</i> MARGARITA DEL VAL LATORRE
36	Genética y Biología Celular del cáncer: neoplasias linfoblásticas de células T precursoras <i>Genetics and Cell Biology of Cancer: T-cell lymphoblastic neoplasms</i> JOSÉ FERNÁNDEZ-PIQUERAS
38	Regulación y función de mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune <i>Regulation and function of proinflammatory mediators and their involvement in immune and inflammatory mediated diseases</i> MANUEL FRESNO ESCUDERO
40	Acciones de los prostanoideos en procesos inflamatorios <i>Prostanoids Actions in Inflammatory Processes</i> MIGUEL ÁNGEL ÍÑIGUEZ PEÑA
42	Bases moleculares y celulares de la fisiopatología asociada a la expresión de antígenos intracelulares <i>Molecular and cellular basis of the physio(patho)logy associated with the expression of intracellular antigens</i> JOSÉ MARÍA IZQUIERDO JUÁREZ
44	Fisiopatología Molecular de la Fibrosis <i>Molecular Pathophysiology of Fibrosis</i> SANTIAGO LAMAS PELÁEZ
46	Grupo de Fisiopatología Molecular de la Inflamación y Fibrosis Peritoneal (PERINFIB) <i>Group for the Study of Peritoneal Inflammation and Fibrosis Molecular Pathophysiology</i> MANUEL LÓPEZ CABRERA
48	Inmunología de los antígenos de la histocompatibilidad <i>Immunology of human histocompatibility antigens</i> JOSÉ A. LÓPEZ DE CASTRO ÁLVAREZ
50	Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas <i>Patho-physiological implications of G protein-coupled receptors signaling networks</i> FEDERICO MAYOR JR
52	Biología celular de la inflamación <i>Cell biology of inflammation</i> JAIME MILLÁN MARTÍNEZ
54	Papel del remodelado de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular <i>Extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system</i> FERNANDO RORÍQUEZ PASCUAL
56	Óxido nítrico en la respuesta inmune adaptativa <i>Nitric Oxide and Adaptive Immune Responses</i> JUAN MANUEL SERRADOR PEIRO
58	Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano <i>Development of the human lymphohematopoietic system</i> MARÍA L. TORIBIO GARCÍA
60	Homeostasis metabólica <i>Metabolic homeostasis</i> IGNACIO VICENTE-SANDOVAL
62	Microdominios de membrana ricos en tetraspaninas en vesículas extracelulares y adhesión y migración celular <i>Tetraspanin-enriched membrane microdomains in extracellular vesicles and cell adhesion and migration</i> MARÍA YÁÑEZ-MO

66	Modulación de la respuesta inmune por virus <i>Viral modulation of the immune response</i> ANTONIO ALCAMÍ PERTEJO
68	Evolución, patogenia y potencial anti-cáncer de los virus ssDNA <i>ssDNA virus evolution, pathogenesis, and anti-cancer potencial</i> JOSÉ M. ALMENDRAL DEL RÍO
70	Ecología Molecular de Ambientes Extremos <i>Molecular Ecology of Extreme Environments</i> RICARDO AMILS PIBERNAT
72	División celular bacteriana y resistencia a antibióticos <i>Bacterial cell division and antibiotics resistance</i> JUAN ALFONSO AYALA SERRANO
74	Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas <i>Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria</i> JOSÉ BERENGUER CARLOS
76	Variabilidad genética de virus RNA <i>Genetic variability of RNA viruses</i> ESTEBAN DOMINGO SOLANS
78	Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos <i>Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds</i> MARÍA FERNÁNDEZ LOBATO
80	Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología <i>Virus Engineering and Nanobiotechnology</i> MAURICIO GARCÍA MATEU
82	Grupo de Modelado Molecular <i>Molecular Modelling Group</i> PAULINO GÓMEZ-PUERTAS
84	Desarrollo de herramientas genéticas para la manipulación de bacterias Gram+ a partir de la caracterización molecular de un plásmido conjugativo de <i>Bacillus</i> <i>Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring transfer and other functions of a Bacillus plasmid pLS20</i> WILFRIED J.J. MEIJER
86	Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia antirretroviral <i>Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy</i> LUIS MENÉNDEZ ARIAS
88	Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana <i>Virus Cell Interaction. The ASFV Model</i> YOLANDA REVILLA NOVELLA
90	Desarrollo de nuevas estrategias para el control y prevención de enfermedades virales: el virus de la fiebre aftosa como modelo <i>New strategies for prevention and control of viral diseases: foot-and-mouth disease virus as a model</i> FRANCISCO SOBRINO
92	Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos <i>mRNA structure and translational control in biological systems</i> IVÁN VENTOSO
96	Identificación de mecanismos genéticos y moleculares que controlan la regeneración en <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Identification of molecular and genetic mechanisms involved in the control of regeneration in Drosophila melanogaster</i> ANTONIO BAONZA CUENCA
98	Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados <i>Morphogenesis and Differentiation of the Vertebrate CNS</i> PAOLA BOVOLENTA NICOLAO
100	Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de <i>Drosophila</i> <i>Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development</i> ANA MARÍA DE BUSTURIA JIMENO
102	Base molecular y celular de la organogénesis en <i>Drosophila</i> <i>Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis</i> SONSOLES CAMPUZANO CORRALES
104	Señalización celular durante el desarrollo de epitelios en <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Signalling pathways directing epithelial development in Drosophila</i> JOSÉ F. DE CELIS
106	Mecanismos de señalización en el desarrollo <i>Signaling mechanisms in development</i> ISABEL GUERRERO VEGA
108	Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos <i>Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds</i> FERNANDO JIMÉNEZ DÍAZ-BENJUMEA
110	Laboratorio de polaridad epitelial <i>Epithelial polarity laboratory</i> FERNANDO MARTÍN BELMONTE
112	Control genético de la morfogénesis en <i>Drosophila</i> <i>Genetic control of morphogenesis in Drosophila</i> GINÉS MORATA PÉREZ
114	Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en <i>Drosophila</i> : sistemas muscular y excretor <i>Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and excretory systems</i> MAR RUIZ GÓMEZ
116	Especificación segmental y formación de patrón en <i>Drosophila</i> <i>Segmental specification and pattern formation in Drosophila</i> ERNESTO SÁNCHEZ-HERRERO ARBIDE

DINÁMICA Y FUNCIÓN DEL GENOMA GENOME DYNAMICS AND FUNCTION	NEUROPATOLOGÍA MOLECULAR / MOLECULAR NEUROPATHOLOGY	120	Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor <i>Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperekplexia and pain</i> CARMEN ARAGÓN RUEDA	172	UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA <i>BIOINFORMATICS UNIT</i> UGO BASTOLLA BUFALINI
		122	Función de las proteínas microtubulares en neuronas <i>Function of microtubular proteins in neurons</i> JESÚS ÁVILA DE GRADO	176	UNIDAD DE CULTURA CIENTÍFICA <i>SCIENCE AND SOCIETY DEPARTMENT</i> JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GUERRERO
		124	Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer: Estudio genómico de modelos celulares patogénicos <i>Genetic bases of Alzheimer's disease: Genomic study of pathogenic cell models</i> MARÍA JESÚS BULLIDO		
		126	Fisiopatología y terapia de las enfermedades neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich <i>Physiopathology and therapy of Neurodegenerative diseases: Friedreich's Ataxia</i> JAVIER DÍAZ-NIDO		SERVICIOS CIENTÍFICOS <i>SCIENTIFIC FACILITIES</i>
		128	Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal <i>Molecular Bases of Neuronal Plasticity</i> FCO. JAVIER DÍEZ GUERRA	180	Servicio de Animalario <i>Animal Facility</i> ELENA HEVIA HERNÁNDEZ
		130	Laboratorio de diferenciación y envejecimiento neuronal <i>Neuronal differentiation and brain aging</i> CARLOS DOTTI	181	Servicio de Bioinformática <i>Bioinformatics Facility</i> DAVID ABIA HOLGADO
		132	Mecanismos de la plasticidad sináptica y contribución a la función cognitiva <i>Mechanisms of synaptic plasticity, and contribution to cognitive function</i> JOSÉ ANTONIO ESTEBAN GARCÍA	182	Servicio de Citometría de Flujo <i>Flow Cytometry Facility</i> BERTA RAPOSO PONCE
		134	Bases moleculares de las sinapsis glutamatérgicas <i>Molecular bases of glutamatergic synapses</i> CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN / FRANCISCO ZAFRA	183	Servicio de Fermentación <i>Fermentation Facility</i> DIONISIO UREÑA RODRÍGUEZ
		136	Lípidos en la fisiología y patología neuronal <i>Lipids in neuronal physiology and pathology</i> MARÍA DOLORES LEDESMA MUÑOZ	184	Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva <i>Genomics and Next-Generation Sequencing Facility</i> FERNANDO CARRASCO RAMIRO
		138	Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central <i>Huntington's disease and other CNS disorders</i> JOSÉ JAVIER LUCAS LOZANO	185	Servicio de Microscopía Electrónica (SME) <i>Electron Microscopy Facility (EMF)</i> MARÍA TERESA REJAS MARCO
		140	Biología de células troncales neurales humanas. Potencial para reposición celular y terapia génica en neurodegeneración <i>Biology of human neural stem cells. Potential for cell and gene therapy in neurodegeneration</i> ALBERTO MARTÍNEZ SERRANO	186	Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC) <i>Optical and Confocal Microscopy Core Facility (SMOC)</i> CARLOS SÁNCHEZ MARTÍN ÁNGELES MUÑOZ ALCALÁ
		142	Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias <i>Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies</i> LOURDES RUIZ DESVIAT	187	Servicio de Química de Proteínas y Proteómica <i>Proteomics and Protein Chemistry Core Facility</i> ANA ISABEL MARINA RAMÍREZ
		144	Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento <i>Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing</i> JORGINA SATRÚSTEGUI GIL-DELGADO	188	Servicio de Transgénesis <i>Transgenesis Facility</i> M ^a BELÉN PINTADO SANJUANBENITO
		146	Mecanismos moleculares de neurodegeneración <i>Molecular mechanism of neurodegeneration</i> FRANCISCO WANDOSELL JURADO	189	Servicio de Transgénesis de <i>Drosophila</i> <i>Drosophila Transgenesis Facility</i> EVA CAMINERO JIMÉNEZ MAR CASADO GARCÍA
		150	Mantenimiento y variabilidad del genoma: enzimología de la replicación y reparación de DNA <i>Genome maintenance and variability: enzymology of DNA replication and repair</i> LUIS BLANCO DÁVILA	192	SERVICIOS GENERALES <i>GENERAL SERVICES</i>
		152	Bases Moleculares de la citopatología viral y fúngica <i>Molecular bases of viral and fungal cytopathology</i> LUIS CARRASCO LLAMAS		
		154	Control traduccional de la respuesta al estrés en eucariotas <i>Translation control of stress response in eukaryotes</i> CÉSAR DE HARO CASTELLA		SEMINARIOS / SEMINARS
		156	Organización funcional del genoma de mamíferos <i>Functional organization of the mammalian genome</i> MARÍA GÓMEZ VICENTEFRANQUEIRA	196	Lecciones Conmemorativas / Memorial Lectures
		158	División celular, replicación del genoma y cromatina <i>Cell division, genome replication and chromatin</i> CRISANTO GUTIÉRREZ	197	Seminarios Severo Ochoa / Severo Ochoa Seminars
		160	Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos <i>Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs</i> ENCARNACIÓN MARTÍNEZ-SALAS	198	Seminarios Special / Special Seminars
		162	Regulación de la expresión génica en <i>Leishmania</i> <i>Regulation of gene expression in Leishmania</i> JOSÉ MARÍA REQUENA ROLANÍA	200	Seminarios Ciclo Avances en Biomedicina / Advances in Biomedicine Seminar Cycle
		164	Replicación del DNA del bacteriófago ø29. Virus de la peste porcina Africana <i>Replication of bacteriophage ø29 DNA. African swine fever virus</i> MARGARITA SALAS FALGUERAS	201	Seminarios Interdepartamentales / Interdepartmental Seminars
		166	Control traduccional de la respuesta al estrés en eucariotas <i>Translation control of stress response in eukaryotes</i> JOSÉ ANTONIO TERCERO ORDUÑA	201	Tesis Doctorales / Doctoral Theses
		168	Grupo Reparación del DNA bacteriano <i>Bacterial DNA repair</i> MIGUEL DE VEGA JOSÉ		

Reflexiones del Director / *Director's Remarks*



José F. de Celis

Director del CBMSO / CBMSO Director

La memoria científica del centro intenta reflejar los logros conseguidos en un periodo de dos años, y es también nuestra tarjeta de presentación a todo aquel interesado en nuestras actividades. Estas memorias se vienen editando con distinta periodicidad desde el año 1975, y en esta serie histórica se puede apreciar con claridad la relevancia que ha tenido la contribución científica de los investigadores de la casa, pasados y presentes, así como la evolución de los conceptos y aproximaciones experimentales que se han venido desarrollando en el CBMSO.

Contemplar de manera crítica las diferentes memorias también es un ejercicio muy ilustrativo sobre la evolución de los grupos de investigación, muchos de los cuales o sus linajes continúan activos.

Es también una manera de apreciar el valor de nuestro centro tanto en su producción científica como en la capacidad que han tenido nuestros investigadores en formar e influenciar a generaciones de excelentes profesionales de la investigación en biología molecular. Participar en la elaboración de dos memorias consecutivas tiene la ventaja de poder precisar la vigencia de observaciones pasadas, y releando el texto que escribí para la memoria anterior me causa una sensación agri dulce. En la parte dulce está sin duda el confirmar “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”. Estas palabras siguen siendo válidas, y creo que todos tenemos que saber apreciar la contribución que desde los servicios científicos y admi-

The CBMSO scientific report represents an effort to document the Centre's achievements and activities of the last two years, and is also our presentation letter to people who could be interested in the activities performed in our Centre. These reports have been edited since 1975 with different periodicity, and the relevance of the scientific contributions made by our scientific personnel, past and present, is unveiled by this historic series. Looking at these reports, the evolution in concepts and experimental approaches developed at the CBMSO is easily recognized. The critical appraisal of our past reports is also very revealing, and speaks about the evolution of our research groups, many of them, or their legacy, still active in our Centre. It is also a way to appreciate the value of our Centre, both regarding its scientific production and the tremendous impact that our researchers have had in educating or influencing generations of excellent scientist in the field of molecular biology.

My involvement in the elaboration of two consecutive reports has given me the advantage to better appreciate the value of past impressions, and revisiting the text that I wrote for the last scientific report leaves me with very mixed feeling. On the one side, it is a pleasure to confirm “the effort, dedication and professionalism of our personnel. These qualities are what really allow the daily functioning of our Centre, both in its administrative and scientific sides”. These remarks retain its value, and I think we all should appreciate the contribution of our scientific and administrative support services to the everyday performance of our Centre. Even though they operate with limited resources, their impact in the activities of the research groups is of critical value and importance. I would also like to acknowledge here the unfading implication displayed by our scientific personnel, not only by carrying out their work in conditions far from ideal, but also by their participation in many aspects of the Centre's activities.

nistrativos se hace en unas condiciones que no son las más adecuadas. También aquí quiero agradecer la implicación que los investigadores y estudiantes tenéis, tanto en continuar realizando vuestro trabajo en condiciones que no son óptimas, como en participar en todos los aspectos del centro para los que se os ha pedido colaboración y ayuda.

A la parte agria contribuyen dos aspectos: el primero se puede resumir repitiendo la frase que utilicé en la memoria anterior: “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”. Como sabéis seguimos sin que se firme este convenio, aunque no perdemos el optimismo de que UAM y CSIC superen las dificultades que existan y podamos anunciar progresos en un futuro cercano. El segundo punto negativo que se repite es la no consecución de la mención como centro de excelencia Severo Ochoa en las últimas convocatorias en las que hemos participado. El planteamiento que se hizo, como todos conocéis, fue progresar en una definición estratégica del centro enfocada a la Biomedicina molecular, con énfasis en la investigación básica en modelos animales que permita entender las bases celulares y moleculares de diferentes patologías. Tengo el convencimiento de que esta definición es la mejor posible dentro de lo que es nuestra realidad y que refleja de manera precisa aquello a lo que se dedica nuestro centro. Las memorias que hemos presentado a estas convocatorias de excelencia son el resultado del trabajo de muchas personas, a las que quiero expresar mi mayor agradecimiento por el esfuerzo que realizaron, y han intentado reflejar de una manera honesta lo que somos y lo que queremos ser. Seguiremos intentándolo. Es siempre posible buscar explicaciones que justifiquen nuestro fracaso sistemático en convencer a los evaluadores que juzgan estas aplicaciones del mérito de nuestro centro. Por ejemplo, en este tipo de convocatorias un centro como el nuestro que es muy heterogéneo y multidisciplinar siempre se encontrará en condiciones mas desventajosas para competir.

A mí personalmente me gustaría utilizar los comentarios de los evaluadores como un acicate y estímulo para seguir progresando. Asumo que la responsabilidad final de impulsar este centro hacia el futuro es fundamentalmente nuestra, de los investigadores que aquí trabajamos, y el hecho de que este año tengamos una evaluación por nuestro comité científico externo debería ser una oportunidad para continuar implementando las medidas que recurrentemente se nos sugieren: dinamizar los procesos de asignación de recursos, promover la incorporación y el desarrollo de jóvenes investigadores y progresar hacia una definición estratégica más precisa de nuestros objetivos.

On the other side, I have been reminded of two frustrating facts. The first one can be summarized by using the same sentence as on the previous scientific report: “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 Centre, and also to elaborate a set of rules to improve its daily management.” As you all know, there is not yet such an administrative agreement between CSIC and UAM, and we can only remain optimistic and hope that our parent institutions overcome whatever difficulties they encounter and that we can announce some progress in the immediate future. The second frustrating point is our failure to obtain the Severo Ochoa Centre of excellence distinction in the last applications in which we have participated. Our presentation, as you all know, consisted in progressing towards a definition of our Centre focused on the fields of Molecular Biomedicine, emphasising basic research in animal models thus allowing the understanding of the cellular and molecular bases of human pathologies. I am very much convinced that this definition is the one reflecting in the best possible way our reality, and includes a large majority of our research groups. The reports we have presented in successive Severo Ochoa’s applications have involved the dedication of many people, and I would like to express my gratitude for the fantastic work and effort they put into it. These reports aimed to represent in all honesty what we are and what we would like to be, and we will keep trying in the future. It is always possible to look for explanations to justify our lack of success in convincing the evaluators of our Centre’s merits. For example, by thinking that a Centre so heterogeneous and multidisciplinary as ours will always be at a disadvantage in this sort of contest.

Personally, I would like to use the evaluators’ comments in a positive manner to promote our progression. I assume that the responsibility to improve our standards is fundamentally ours, of the scientists working here, and the fact that this year we will pass our evaluation by the SAB should be an opportunity to implement the measures that we are recurrently suggested: to improve the processes of resource allocation to the research groups, to continue promoting the incorporation and development of scientist in the first years of their careers, and to progress towards a better strategic definition of our objectives.



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

Alberto Martínez Serrano



DEPARTMENT OF
MOLECULAR
NEUROPATHOLOGY

Paola Bovolenta Nicolao



DEPARTMENT OF
DEVELOPMENT AND
REGENERATION

Crisanto Gutiérrez Armenta



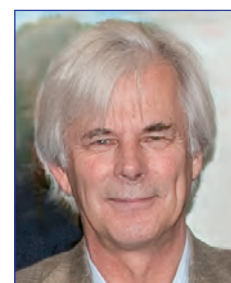
DEPARTMENT OF
GENOME DYNAMICS
AND FUNCTION



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



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

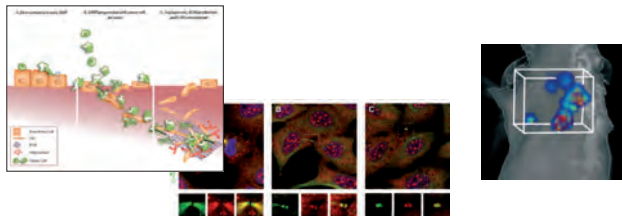


Dr. Reinhard Faessler
Department of Molecular Medicine
Max Planck Institute of Biochemistry
Martinsried, Germany

Scientific Advisory Board (SAB)

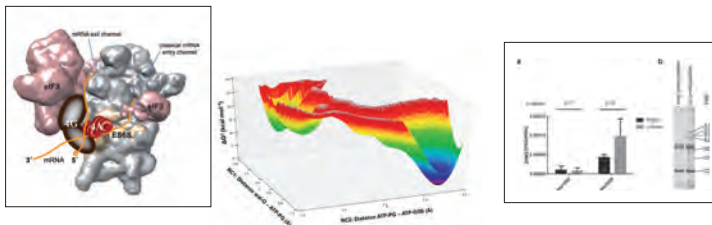
CELL BIOLOGY AND IMMUNOLOGY

23 Groups



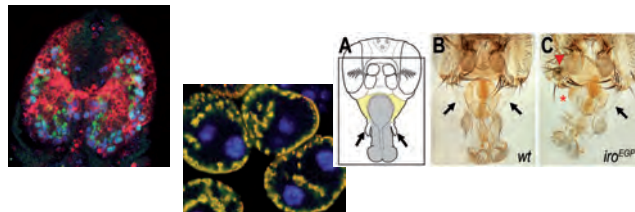
VIROLOGY AND MICROBIOLOGY

14 Groups



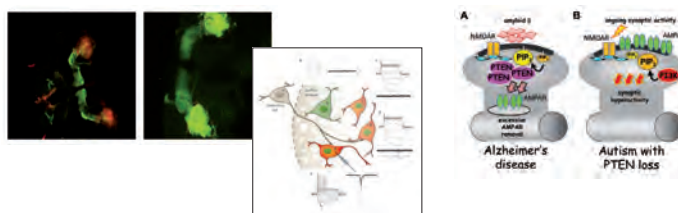
DEVELOPMENT AND REGENERATION

11 Groups



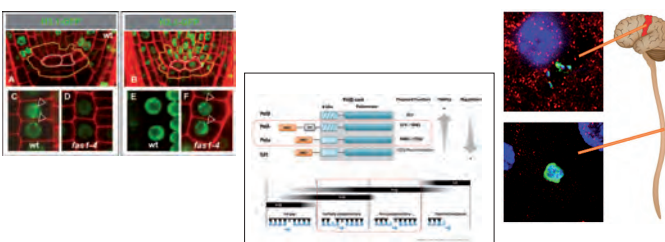
MOLECULAR NEUROPATHOLOGY

14 Groups

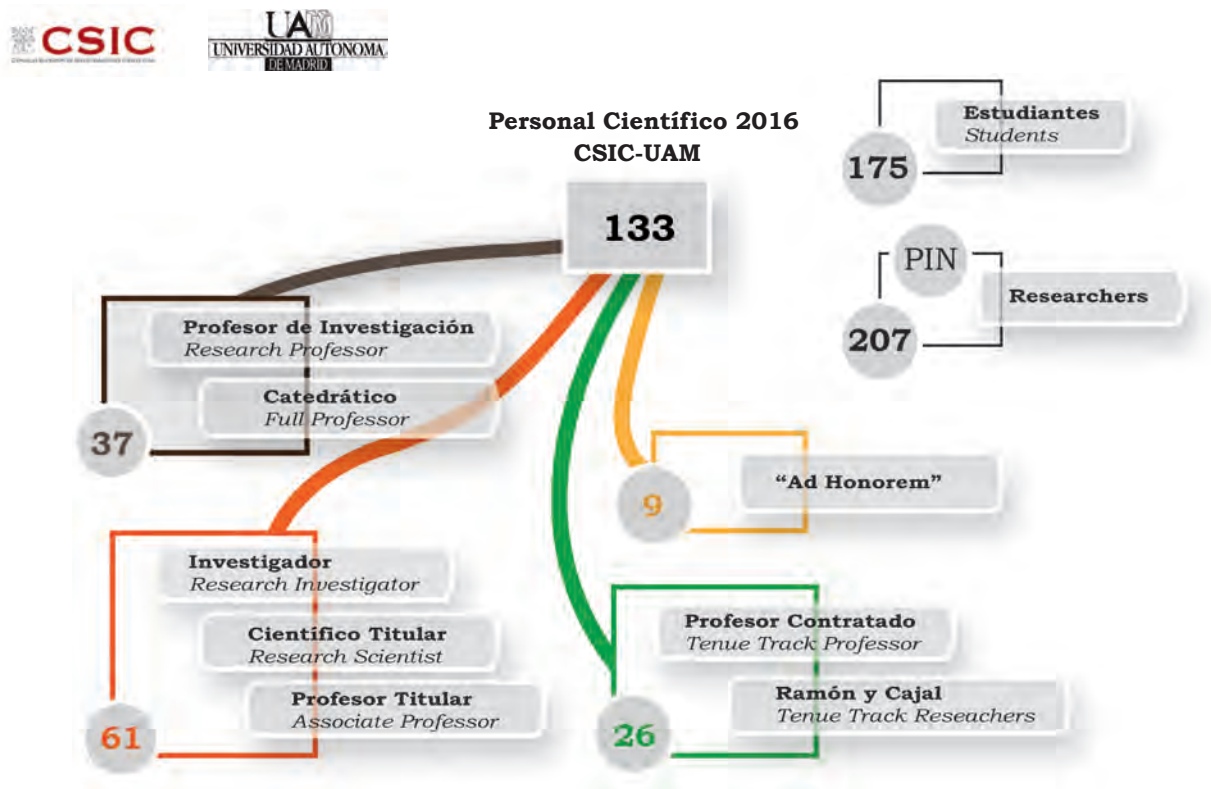


GENOME DYNAMICS AND FUNCTION

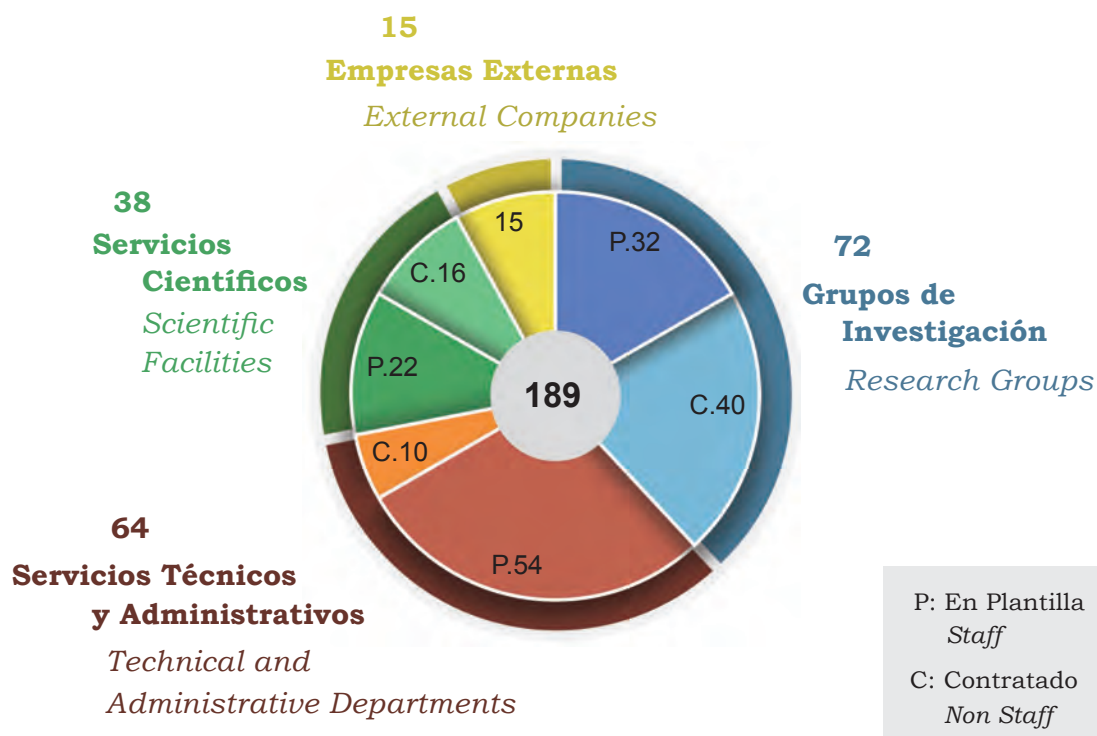
10 Groups



Scientific Staff

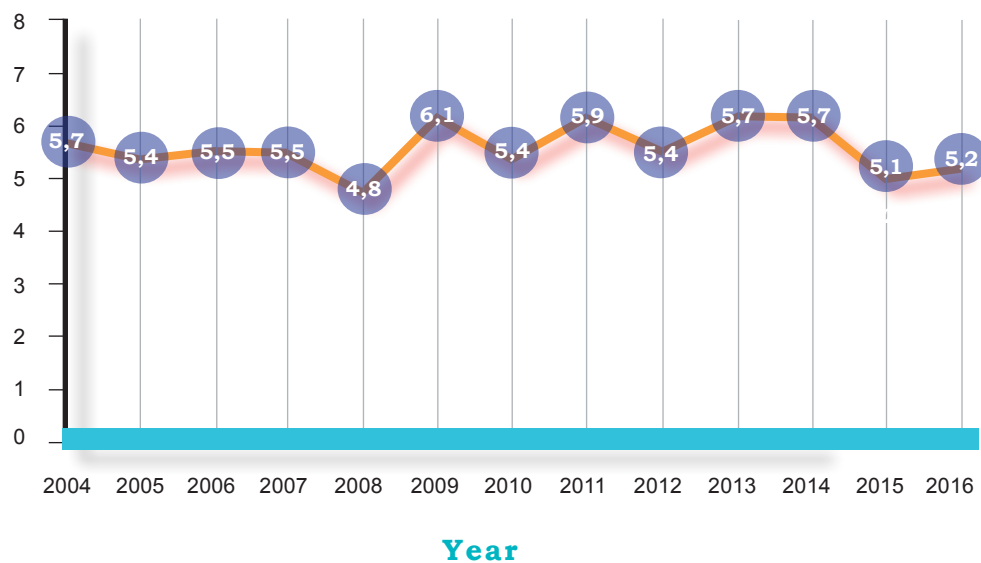


Research Support Personnel



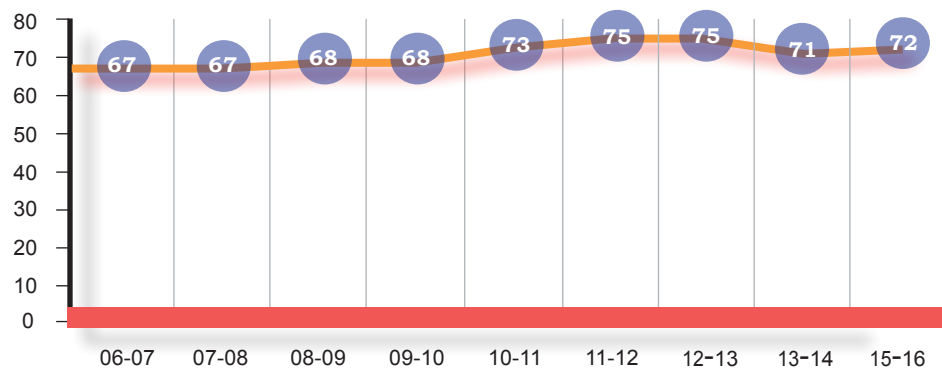
2004-2016

Average Impact Factor



2006-2016

Research Lines



Awards and Honors

2015

MARGARITA SALAS

Galardonada “Mujer Científica 2015” por la Fundación Internacional Woman’s Week
Aula “Margarita Salas” en la Casa de las Artes y las Ciencias. Lluarca. Asturias
Figura Margarita Salas en la Sala de la Ciencia en el Museo de Cera de Madrid
Medalla de Honor de la Real Academia Nacional de Medicina

MARTA NAVARRETE

IV Premio Olympus para jóvenes
Bolsa de Investigación LOREAL-UNESCO “For woman in Science”
Proyecto del Plan Nacional para Jóvenes Investigadores

LOLA LEDESMA

Premio de la Fundación Americana Wylder Nation por Investigación en enfermedades raras

CÉSAR COBALEDA

Premio Nacional FEDER 2015 enfermedades raras

GINÉS MORATA

Premio Nacional de Genética 2015

2016

MARGARITA SALAS FALGUERAS

Medalla Echegaray de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Presidenta del Comité Ejecutivo de la Lección Conmemorativa Jiménez Díaz
Miembro del Consejo Rector de la Agencia Estatal de Investigación
Denominación “Margarita Salas” al IES Sevilla Este

JOSÉ ANTONIO LÓPEZ

Premio Especial del Jurado “Ciencia en Acción”

JESÚS ÁVILA

Nombrado AAAS Fellow por la American Association for the Advancement of Science (AAAS)

SANTIAGO LAMAS

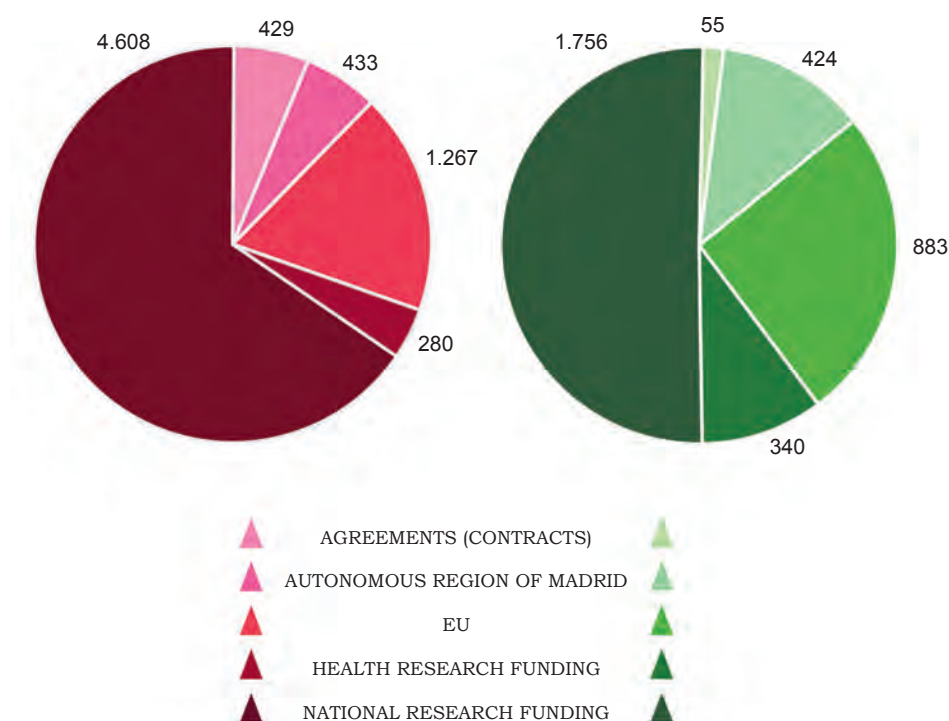
“Health Science Prize” del Oxygen Club of California

Total CBMSO Staff Honors

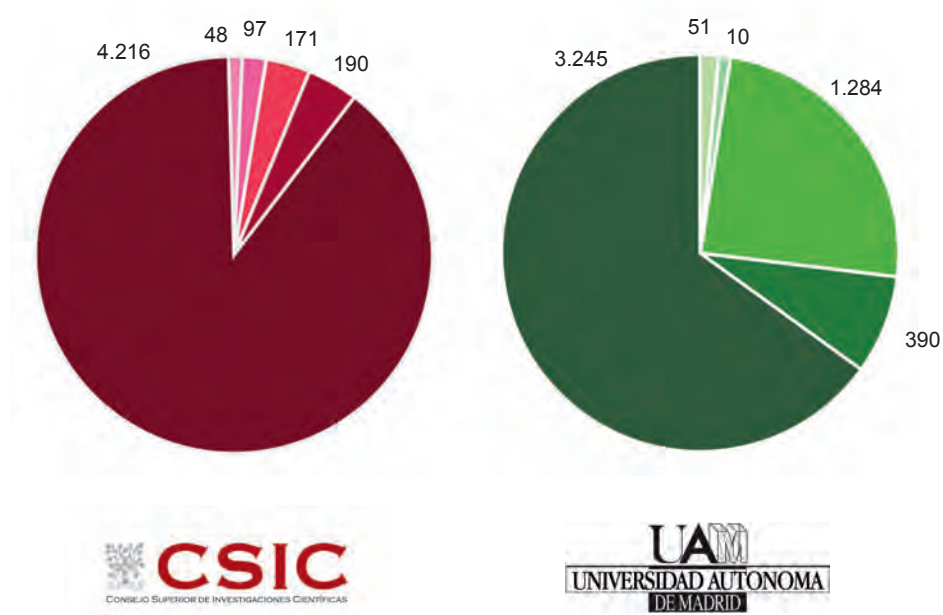
- 2 LAUREATES OF THE PRÍNCIPE DE ASTURIAS DE INVESTIGACIÓN
- 3 LAUREATES OF THE PREMIO MÉXICO DE INVESTIGACIÓN (OF 19 IN TOTAL)
- 3 LAUREATES OF THE PREMIO JAIME I DE INVESTIGACIÓN
- 5 LAUREATES OF THE RAMÓN Y CAJAL NATIONAL PRIZE
- 17 DOCTORS “HONORIS CAUSA” OF SPANISH AND FOREIGN UNIVERSITIES
- 2 MEMBERS OF THE USA’S NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
- 9 SPANISH ROYAL ACADEMIES MEMBERS

2015

Financing: Overall Data (*)



2016



* 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
DROSOPHILA 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



23 Grupos / 23 Groups

- | | | |
|----|----------------------------------|--|
| 18 | BALBINO ALARCÓN SÁNCHEZ | Transmisión de señales a través del receptor para el antígeno de células T
<i>Signal transduction through the T cell antigen receptor</i> |
| 20 | MIGUEL A. ALONSO LEBRERO | Biogénesis del cilio primario
<i>Primary cilium formation</i> |
| 22 | PEDRO BONAY MIARONS | Glicogenómica Funcional
<i>Functional Glycogenomics</i> |
| 24 | CARLOS CABAÑAS GUTIÉRREZ | Interacciones funcionales entre la tetraspanina CD9 y moléculas de adhesión celular
<i>Functional interactions between tetraspanins and cell adhesion molecules</i> |
| 26 | SUSANA CADENAS ÁLVAREZ | Fisiopatología mitocondrial
<i>Mitochondrial pathophysiology</i> |
| 28 | CÉSAR COBALEDA HERNÁNDEZ | Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer
<i>Cellular Plasticity in Development and Cancer</i> |
| 30 | ISABEL CORREAS HORNERO | Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática
<i>Cytoskeleton-plasma membrana interactions</i> |
| 32 | JOSÉ M. CUEZVA | Biogénesis y función de la mitocondria y su repercusión en patología
<i>Biogenesis and function of mitochondria and its role in pathology</i> |
| 34 | MARGARITA DEL VAL LATORRE | Inmunología Viral
<i>Viral Immunology</i> |
| 36 | JOSÉ FERNÁNDEZ-PIQUERAS | Genética y Biología Celular del cáncer: neoplasias linfoblásticas de células T precursoras / <i>Genetics and Cell Biology of Cancer: T-cell lymphoblastic neoplasms</i> |
| 38 | MANUEL FRESNO ESCUDERO | Regulación y función de mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune / <i>Regulation and function of proinflammatory mediators and their involvement in immune and inflammatory mediated diseases</i> |
| 40 | MIGUEL ÁNGEL ÍÑIGUEZ PEÑA | Acciones de los prostanoïdes en procesos inflamatorios
<i>Prostanoids actions in inflammatory processes</i> |



Biología Celular e Inmunología

Cell Biology and Immunology

- 42 JOSÉ MARÍA IZQUIERDO JUÁREZ** 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*
- 44 SANTIAGO LAMAS PELÁEZ** Fisiopatología Molecular de la Fibrosis
Molecular Pathophysiology of Fibrosis
- 46 MANUEL LÓPEZ CABRERA** Grupo de Fisiopatología Molecular de la Inflamación y Fibrosis Peritoneal (PERINFIB) / *Group for the Study of Peritoneal Inflammation and Fibrosis Molecular Pathophysiology*
- 48 JOSÉ A. LÓPEZ DE CASTRO ÁLVAREZ** Inmunología de los antígenos de histocompatibilidad
Immunology of human histocompatibility antigens
- 50 FEDERICO MAYOR Jr** Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas / *Patho-physiological implications of G protein-coupled receptors signaling networks*
- 52 JAIME MILLÁN MARTÍNEZ** Biología celular de la inflamación
Cell biology of inflammation
- 54 FERNANDO RODRÍGUEZ PASCUAL** Papel del remodelado de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular
Extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system
- 56 JUAN MANUEL SERRADOR PEIRÓ** Óxido nítrico en la respuesta inmune adaptativa
Nitric Oxide and Adaptive Immune Responses
- 58 MARÍA L. TORIBIO GARCÍA** Desarrollo del sistema linfohematopoyético humano
Development of the human lymphohematopoietic system
- 60 IGNACIO VICENTE-SANDOVAL** Homeostasis metabólica
Metabolic homeostasis
- 62 MARÍA YÁÑEZ-MO** Microdominios de membrana ricos en tetraspaninas en vesículas extracelulares y adhesión y migración celular / *Tetraspanin-enriched membrane microdomains in extracellular vesicles and cell adhesion and migration*

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:
Diana Reyes
Nadia Martín
Clara Oeste
Ana Martínez
Pilar Mendoza

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Enrique Calleja
Viola Boccasavia

Elena Rodríguez
Ana Villanueva

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

Estudiantes / Undergraduate Students:
Celia Alda,
Raúl Almendro
Jorge Díaz

Resumen de investigación

La activación de los linfocitos T requiere el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por MHC (pMHC) por el receptor para antígeno (TCR). El TCR contacta los complejos pMHC extracelularmente a través de sus subunidades de secuencia variable α y β que tienen dominios citoplásmicos muy cortos. Por lo tanto, deben transferir la señal desencadenada por la unión de pMHC a las subunidades CD3 que a su vez reclutan a proteínas efectoras intracelulares. Hemos propuesto que cambios conformacionales en el TCR convierten los contactos entre pMHC y las subunidades α y β en señales intracelulares dirigidas por CD3 y que resultan en la activación de los linfocitos T. Una de las consecuencias del cambio conformacional en el TCR es la exposición de una secuencia rica en prolina de CD3 ϵ que queda disponible para unirse a la proteína adaptadora citoplásmica Nck. Hemos desarrollado inhibidores de bajo peso molecular que interfieren con el reclutamiento de Nck al TCR como agentes inmunomoduladores. Estos inhibidores pueden administrarse por vía oral y muestran un potente efecto profiláctico y terapéutico en diferentes modelos de enfermedad autoinmune a la vez que respetan la respuesta de los linfocitos T contra microorganismos patógenos. Otro efector citoplásmico del TCR es la GTPasa RRas2 (TC21) que se une constitutivamente al TCR no fosforilado y desempeña papeles importantes en la homeostasis de linfocitos T a través de la activación de PI3K. Estamos estudiando el papel de RRas2 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 y leucemias B y T.

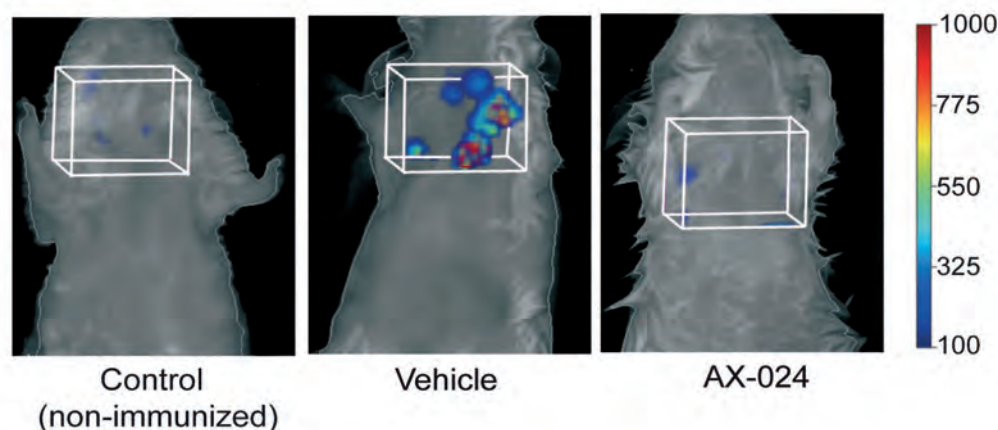


Figura 1. Efecto del tratamiento con AX-024-HCl en un modelo de asma alérgico inducido por ovoalbúmina. La infiltración de las vías respiratorias bajas por células inflamatorias se examinó en animales vivos mediante Tomografía Molecular de Fluorescencia (FMT). Cortesía de Pilar Martín, CNIC.

Figure 1. Effect of AX-024-HCl in a model of ovalbumin-induced allergic asthma. Recruitment of inflammatory cells to the lungs of immunized mice was examined in live animals by quantitative Fluorescence Molecular Tomography (FMT). Courtesy of Pilar Martín, CNIC.

Research summary

T-lymphocyte activation requires recognition of antigenic peptides on MHC (pMHC) by the T cell antigen receptor (TCR). The TCR contacts the antigen extracellularly through its variable α and β chains, which have very short cytoplasmic tails, so that signal initiation is passed on to the CD3 subunits, which contain longer tails that can contact intracellular interactors. We have proposed that conformational changes mediate the conversion of pMHC- α/β TCR contacts into CD3-driven intracellular signals, thus triggering the TCR. One of the consequences of the conformational change in the TCR is the exposure of a proline-rich sequence (PRS) of CD3 ϵ that becomes available for binding to the adaptor protein Nck. We have developed small molecular weight inhibitors of the recruitment of Nck to the TCR as immunomodulatory agents. These inhibitors are orally available and show a potent prophylactic and therapeutic effect in different models of autoimmune diseases while sparing the T cell response to pathogens. Another direct effector of the TCR is the small GTPase R Ras2 (also known as TC21), which binds constitutively to the non-phosphorylated TCR and plays important roles in homeostatic signaling through PI3K. We are studying the role of R Ras2 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 and leukemias.

Publicaciones / Publications

Beck-García, K., Beck-García, E., Bohler, S., Zorzin, C., Sezgin, E., Levental, I., Alarcón, B. and Schamel, W.W. (2015) Nanoclusters of the resting T cell antigen receptor (TCR) localize to non-raft domains. *Biochim Biophys Acta*. **1853**, 802-809.

Fabbiano, S., Menacho-Márquez, M., Robles-Valero, J., Pericacho, M., Matesanz-Marín, A., García-Macías, C., Sevilla, M.A., Montero, M.J., Alarcón, B., López-Novoa, J.M., Martín, P. and Bustelo, X.R. (2015) Immunosuppression-Independent Role of Regulatory T Cells against Hypertension-Driven Renal Dysfunctions. *Mol Cell Biol*. **35**, 3528-3546.

Martin-Blanco, N., Jiménez Teja, D., Bretones, G., Borroto, A., Caraballo, M., Screpanti, I., León, J., Alarcón, B., and Canelles, M. (2015) CD3 ϵ recruits Numb to promote TCR degradation. *Int Immunol*. 2016 **28**, 127-37.

Alarcón, B., Reth, M. and Schamel, W. (2015). Preface to special issue on nanoscale membrane organisations. *Biochim Biophys Acta*. **1853**, 765-766.

Oeste, C.L., and Alarcón, B. (2015) Editorial: Nck has a knack for T cell differentiation. *J Leukoc Biol*. **98**, 297-298.

Alarcon, B., and van Santen, H. (2015). T cell Receptor Triggering. In: Bradshaw, R. and Stahl, P. (ed) Encyclopedia of Cell Biology, Elsevier, pp. 650-659.

Swamy, M., Beck-Garcia, K., Beck-Garcia, E., Hartl, F.A., Morath, A., Yousefi, O.S., Dopfer, E.P., Molnár, E., Schulze, A.K., Blanco, R., Borroto, A., Martín-Blanco, N., Alarcon, B., Höfer, T., Minguet, S. and Schamel, W.W.A. (2016) A cholesterol-based allosteric model of T cell receptor phosphorylation. *Immunity* **44**, 1091-101.

Blas-Rus, N., Bustos-Morán, E., Pérez de Castro, I., de Cárcer, G., Borroto, A., Camafeita, E., Jorge, I., Vázquez, J., Alarcón, B., Malumbres, M., Martín-Córceres, N.B., and Sánchez-Madrid, F. (2016) Aurora A drives early signaling and vesicle dynamics during T cell activation. *Nat Commun*. **7**, 11389.

Borroto, A., Reyes-Garau, D., Jiménez, M.A., Carrasco, E., Moreno, B., Martínez-Pasamar, S., Cortés, J.R., Perona, A., Abia, D., Blanco, S., Fuentes, M., Arellano, I., Lobo, J., Heidarieh, H., Rueda, J., Esteve, P., Cibrián, D., Martínez-Riaño, A., Mendoza, P., Prieto, C., Calleja, E., Oeste, C.L., Orfao, A., Fresno, M., Sánchez-Madrid, F., Alcamí, A., Bovolenta, P., Martín, P., Villoslada, P., Morreale, A. Messeguer, A. and Alarcon, B. (2016) First-in-class inhibitor of the T-cell receptor for the treatment of autoimmune diseases. *Sci Transl Med* **8**, 370ra184.

Oeste, C.L., and Alarcon, B. (2016). T lymphocytes: Activation. In: Delves, P. (ed) eLife Sciences, Wiley and sons, pp. 1-9.

Martin-Blanco, N., van Santen, H., and Alarcon, B. (2016). TCR signaling: Proximal signaling. In: Ratcliffe, J.H. (ed) Encyclopedia of Immunobiology. Elsevier, pp. 1-8.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Pilar Mendoza Daroca (2016). La GTPasa R Ras2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal. Universidad Autónoma de Madrid. Balbino Alarcón.

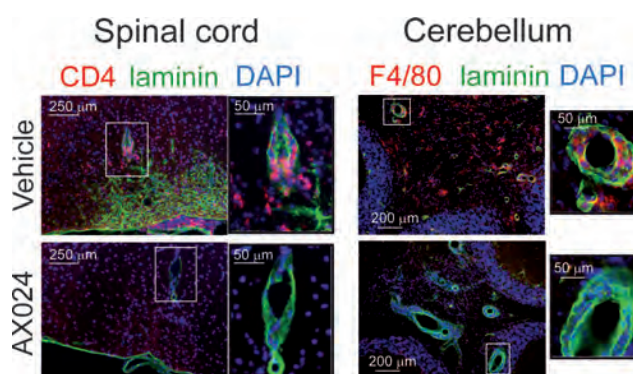


Figura 2. Efecto del tratamiento con AX-024-HCl en un modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental. La infiltración de los vasos y el parénquima del cerebelo y de la médula espinal por linfocitos T CD4+ y por macrófagos F4/80+ se muestra en rojo. Cortesía de Javier Rueda y Paola Bovolenta, CBMSO.

Figure 2. Effect of AX-024-HCl on CNS infiltration in an Experimental Autoimmune Encephalitis model. Vessel and parenchyma infiltration of the cerebellum and spinal cord by CD4+ T cells and F4/80+ macrophages is shown in red. Courtesy of Javier Rueda y Paola Bovolenta, CBMSO.

Biogénesis del cilio primario

Primary cilium formation



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

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

Miguel Bernabé Rubio
Jaime Fernández Barrera
Javier Casares Arias
Armando Rubio Ramos

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alodia Lacueva Aparicio
Leticia Labat de Hoz
Andrea de la Fuente Alonso

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Laura Fernández Martín

Resumen de investigación

El objetivo general de nuestro grupo es comprender mejor el proceso de polarización celular mediante la caracterización de los mecanismos y la maquinaria implicados en procesos de transporte vesicular polarizado. En los dos últimos años nuestra atención se ha centrado principalmente en el estudio del mecanismo de biogénesis del cilio primario de células epiteliales.

El cilio primario es un apéndice solitario que emerge de la superficie celular en la mayoría de las células de los mamíferos. Una de las características principales de los cilios primarios es que, a diferencia de los cilios móviles de las células multiciliadas o de las células que utilizan cilios o flagelos para moverse, el cilio primario es inmóvil. El cilio primario controla una gran variedad de rutas de señalización como las reguladas por Hedgehog, Wnt, Notch. La importancia del cilio está avalada por que su funcionamiento defectuoso produce una gran variedad de trastornos en el hombre, que colectivamente se denominan ciliopatías.

Nuestro grupo ha encontrado que los restos del cuerpo medio o cuerpo de Flemming, estructura que se forma en el puente intercelular durante la citoquinesis, desempeña un papel esencial en este proceso. En células epiteliales polarizadas, una vez roto el puente intracelular, el cuerpo medio es heredado por una de las células hijas y se mueve a lo largo de la membrana apical desde una posición periférica a la posición central, donde se encuentra anclado el centrosoma. Una vez reunidas ambas estructuras, el cuerpo medio habilita al centrosoma para la formación del cilio primario por un mecanismo que actualmente está siendo investigado por nuestro grupo. Además de ofrecer una visión totalmente novedosa sobre la biogénesis del cilio primario, nuestro trabajo establece una conexión funcional entre las tres principales estructuras celulares basadas en los microtúbulos: el centrosoma, el cuerpo medio y el cilio primario.

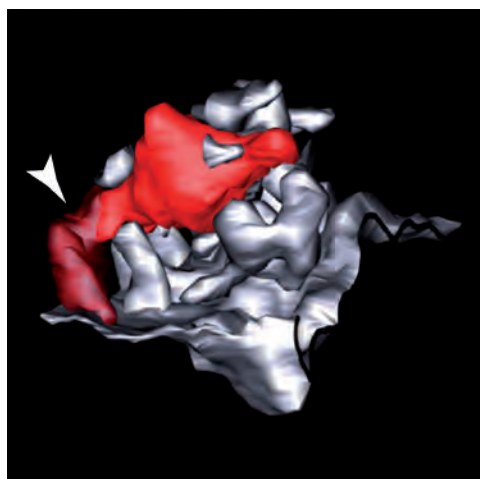


Figura 1. Reconstrucción tridimensional de un cuerpo medio localizado en el centro de la superficie apical. Se representa el cuerpo medio (rojo), el tallo (rojo oscuro) y la membrana apical adyacente (gris). La cabeza de flecha señala al tallo que une el cuerpo medio con el resto de la membrana apical. Realizado en colaboración con Germán Andrés (CBMSO) y José J. Fernández (CNB).

Figure 1. Three-dimensional reconstruction of a central midbody remnant. The remnant (red), the tether (dark red) and adjacent apical membrane (gray) are represented. The arrowhead indicates the tether. Done in collaboration with Germán Andrés (CBMSO) and José J. Fernández (CNB).

Research summary

Our group's aim is to advance our knowledge of polarized membrane trafficking through the functional characterization of the mechanisms and protein machinery involved in this process. In the last two years our attention has focused mainly on the study of the mechanism of biogenesis of the primary cilium of epithelial cells.

The primary cilium is a single appendage that projects from the cell surface of most mammalian cells. One of the main features of primary cilia is that, unlike the motile cilia of multiciliary cells or of cells that use cilia or flagella for movement, they are non-motile. 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 cilium is associated with a long list of human developmental and degenerative disorders, collectively referred to as ciliopathies, that affect nearly every major body organ.

Our group has discovered that the remnant of the midbody, also known as the Flemming body, a structure that forms in the middle of the intercellular bridge during cytokinesis, plays an essential role in this process. In polarized epithelial cells, once the intercellular bridge is cleaved at one site, the midbody is inherited as a remnant by one of the daughter cells. The remnant moves along the apical membrane from a peripheral to a central position, where the centrosome has already docked. Once the two structures have met, the midbody enables the centrosome to form a primary cilium by a mechanism that is currently being investigated in our laboratory. In addition to developing a new model of primary cilium biogenesis, our work has established a functional connection between the three main microtubule-based cell compartments: the centrosome, the midbody and the primary cilium.

Publicaciones / Publications

Bernabé-Rubio, M., Andrés, G., Casares-Arias, J., Fernández, J.J., Fernández-Barrera, J., Rangel, L., Reglero-Real, N., Gershlick, D. C., Fernández, J. J., Millán, J., Correas, I., Miguez, D. G., and Alonso, M. A. (2016) Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **214**, 259-273.

Marcos-Ramiro, B., García-Weber, D., Barroso, S., Feito, J., Ortega, M.C., Cernuda-Morollón, E., Reglero-Real, N., Fernández-Martín, L., Durán, M. C., Alonso, M. A., Correas, I., Cox, S., Ridley, A. J. and Millán, J. (2016) RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* **213**, 385-402.

Bartolini, F., Andrés-Delgado L., Qu, X., Nik, S., Ramalingam, Alonso, M. A., and Gundersen, G. G. (2016) An mDia1-INC2 formin activation cascade facilitated by IQGAP1 regulates stable microtubules in migrating cells. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1797-1808.

Ventimiglia, L. N. and Alonso, M. A. (2016) Biogenesis and function of T cell-derived exosomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 84.

Rodríguez-Fraticelli, A. E., Bagwell, J., Bosch-Fortea, M., Boncompain, G., Reglero, N., García-León, M. J., Andrés, G., Toribio, M. L., Alonso, M. A., Millán, J., Perez, F., Bagnat, M., and Martín-Belmonte, F. (2015) Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nat. Cell Biol.* **17**, 241-250.

Rumah, K. R., Ma, Y., Linden, J. R., Oo, M. L., Anrather, J., Schaefer-Wiemers, N., Alonso, M. A., Fischetti, V. A., McClain, M. S., and Vartanian, T. (2015) The Myelin and Lymphocyte protein MAL is required for binding and activity of Clostridium perfringens ϵ -toxin. *PLoS Pathog.* **11**: e1004896.

Reales, E., Bernabé-Rubio, M., Casares-Arias, J., Rentero, C., Fernández-Barrera, J., Rangel, L., Correas, I., Enrich, C., Andrés, G. and Alonso, M. A. (2015) The MAL protein is crucial for proper membrane condensation at the ciliary base, which is required for primary cilium elongation. *J. Cell Sci.* **128**, 2261-2270.

Ventimiglia, L. N., Fernández-Martín, L., Martínez-Alonso, M., Antón, O.M., Guerra, M., Martínez-Menárguez, J. A., Andrés, G., and Alonso, M. A. (2015) Regulation of exosome secretion by the integral MAL protein in T cells. *J. Immunol.* **195**, 810-814.

Otras actividades / Other activities

Miembro del Panel Científico de Euro-Bioimaging

Member of the Scientific Review Panel during Euro-Bioimaging's Interim Operation.

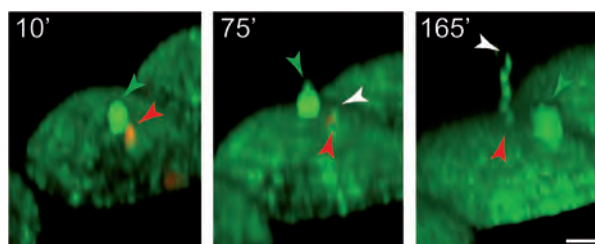
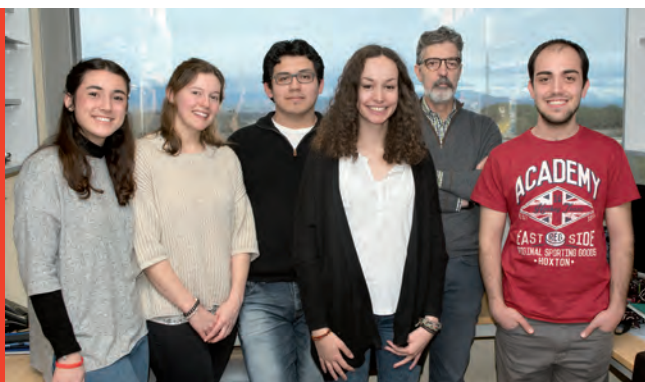


Figura 2. El cuerpo medio activa al centrosoma para la formación del cilio primario. Reconstrucción tridimensional del proceso de formación del cilio primario en células epiteliales a partir de imágenes obtenidas por videomicroscopía de células que expresaban GFP-tubulina (que marca el cuerpo medio y más tarde también al cilio primario) y dsRed-centrina (que marca el centrosoma). Las cabezas de flecha verdes y rojas señalan al cuerpo medio y al centrosoma, respectivamente.

Figure 2. The midbody remnant enables the centrosome for primary cilium formation. Three-dimensional reconstruction of images obtained by videomicroscopic analysis of cells expressing GFP-tubulin (midbody remnant and primary cilium) and dsRed-centrin (centrosome) during the movement of the midbody to encounter the centrosome for primary cilium formation. The green and red arrowheads point to the midbody remnant and the centrosome, respectively.

Glicogenómica Funcional

Functional Glycogenomics



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

Doctor vinculado / *Ad Honorem*
Carlos Alonso Bedate

Becarios / *Contratados Predoctorales*
Graduate Students:
Laura Corvo Villen

Estudiantes /
Undergraduate Students:

José Carlos Paredes
Cristian González
Paula García Barahona
María Teresa Aguilera
Sonsoles Barriola

Postdoctoral Visitante
Candy Nakad (Venezuela)

Resumen de investigación

La N-glicosilación es la modificación post-traducciona más abundante, diversa y dinámica en la naturaleza, implicando más de 200 genes. La glicosilación permite incrementar el espectro funcional de las proteínas modificadas, al generar toda una variedad de glicoformas con características funcionales distintas. La glicosilación está indirectamente implicada en la patofisiología de casi cualquier patología. El 95 % de las proteínas secretadas y de membrana están glicosiladas. Por lo tanto, la síntesis de glicanos es afectada más significativamente por estados patológicos que la síntesis de proteínas. Dado que su estructura no puede ser directamente derivada de la información genómica y/o proteómica, se requiere un análisis estructural directo para el cual las metodologías están en pleno desarrollo. El grupo ha invertido los dos últimos años en implementar y validar una plataforma tecnológica que permita establecer el análisis estructural del N-glicoma en suero, plasma o tejidos. La evaluación glicómica en individuos (no poblaciones) permite establecer potenciales asociaciones con el riesgo de enfermedad, progresión de la patología y eficacia terapéutica, como se ha demostrado en cáncer e inflamación crónica (artritis reumatoide). El grupo de investigación está implementando esta aproximación experimental en tres patologías infecciosas: enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), Leishmaniasis y neurocisticercosis, en la búsqueda de potenciales marcadores serológicos (basados en el perfil glicano) que permitan aumentar la fiabilidad de los métodos diagnósticos serológicos actuales, así como evaluar la eficacia terapéutica de los tratamientos a fin de poder establecer marcadores de cura eficaces para estas patologías. Los resultados de una cohorte evaluada han permitido identificar diversas glicanos y tendencias estructurales características que definen y distinguen el estado pre y post tratamiento en pacientes chagasicos de infección oral, permitiendo identificar aquellos pacientes refractarios al tratamiento mucho antes, así como el estado latente y activo de la neurocisticercosis previamente solo posible por técnicas de imagen (RMN). Los resultados de estos primeros análisis confirman el potencial de la glicómica como herramienta en la búsqueda de marcadores de enfermedad.

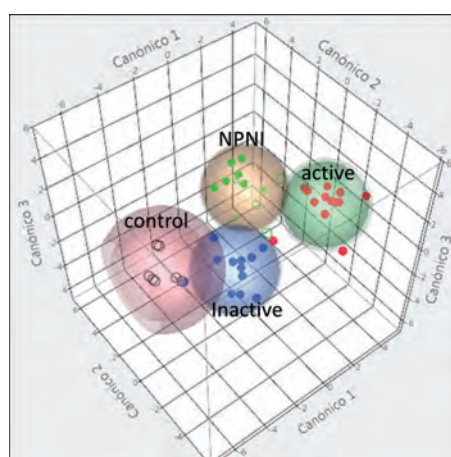


Figura 1.
Análisis discriminante de pacientes empleando el perfil glicómico como variables, permite discriminar los cuatro grupos clínicos definidos.
Control: Sujetos sanos
NPNI: Neuropatías no infecciosas
Inactiva: Neurocisticercosis bajo HP10
Activa: Neurocisticercosis alto HP10

Figure 1. Discriminant analysis of human samples by using the glycan peaks profile as variables allows discriminating the four clinically defined cohorts.
Control: Healthy subjects
NPNI: Neuropathologies noninfectious etiology.
Inactive: low HP10 Neurocysticercosis
Active: High HP10 Neurocysticercosis

Research summary

The Glycosylation is the most abundant, diverse and dynamic post-translational modification in nature, generating one of the most complex biological molecules found in nature, the glycans. Those are covalent conjugates of an oligosaccharide to certain amino acid residues on the protein backbone, resulting in a plethora of glycoforms potentially exhibiting a wide spectrum of functional and biological proteins for a single gene product. Almost all secreted and membrane proteins are glycosylated and hence almost all plasma and serum proteins are glycoproteins. Glycan biosynthesis is more significantly affected by disease states than by protein production. Glycomics, therefore holds considerable promise specifically as disease markers. The nonlinear and non-template based synthesis of glycans make head to head compare glycomics to proteomics is not technically possible, and complex structural analysis of glycome is necessary in order to get a glycomic profile. The group has devoted the last two years to implement and validate a novel technological platform that allows us to analyze the N-glycome from minute amounts of sera, plasma or tissues, unique at the UAM campus. The glicomic evaluation of individuals (not populations) allows to establish associations to disease progression, therapeutic efficacy or failure and reinfections. The system has been used to analyze samples from three defined infectious disease from which we have clinically defined cohorts (Chagas disease, Leishmaniasis and Neurocysticercosis). The data available so far has allowed to identify some molecular markers for efficacy during the treatment with Benznidazole for acute Chagas disease patients, and able to discriminate the latent form active form of neurocysticercosis, previously only possible by using image systems like NMR.

Publicaciones / Publications

Immune cells from patients with psoriasis are defective in inducing indoleamine 2,3-dioxygenase expression in response to inflammatory stimuli. Llamas-Velasco M, Bonay P, José Concha-Garzón M, Corvo-Villén L, Vara A, Cibrián D, Sanguino-Pascual A, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Daudén E. (2016). *Br J Dermatol*.

Coadministration of the Three Antigenic *Leishmania infantum* Poly (A) Binding Proteins as a DNA Vaccine Induces Protection against *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. Soto M, Corvo L, Garde E, Ramírez L, Iniesta V, Bonay P, Gómez-Nieto C, González VM, Martín ME, Alonso C, Coelho EA, Barral A, Barral-Netto M, Iborra S. (2015). *PLoS Negl Trop Dis*. 9:e0003751.

Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. Pineda MA, Cuervo H, Fresno M, Soto M, Bonay P. (2015). *J Infect Dis*. 1;212:1160-71.

Interactions of human galectins with *Trypanosoma cruzi*: binding profile correlate with genetic clustering of lineages. Pineda MA, Corvo L, Soto M, Fresno M, Bonay P. (2015). *Glycobiology*. 25:197-210.

Serum N-glycome as potential biomarker of disease status and therapeutic efficacy in Chagas' disease. Jenny Molina, Elizabeth Ferrer, Leidy Herrera, María Pérez Pallares, Aranzazu Arellano, María Álvarez, Francesca Norman, Begoña Monge-Maillo, José Antonio Pérez-Molina, Rogelio Lopez-Velez, Manuel Soto, Pedro Bonay. (2015). *Glycoconjugate Journal*. 32:209.

Pedro Bonay, Manuel Fresno, Nuria Girones Pujol, Manuel Carlos López López. Enfermedad de Chagas. Ed. Sial Pigmalión. 2015. "Diagnóstico de las Enfermedades desatendidas: moléculas y trópicos". Esperanza Rodríguez de las Parras, José Miguel Rubio Muñoz y Jorge Alvar Ezquerro, Coordinadores. ISBN 978-16447-26-8.

Otras actividades / Other activities

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

Miembro del Comité Científico del XXIII International Glycoconjugate Symposium (GLYCOXXIII) celebrado en Split, Croacia en septiembre 2015.

Tesis doctorales / Doctoral theses

María Roncales Poza. Cultivo y ensayos *in vitro* de las formas eritrocíticas del parásito productor de la malaria (*Plasmodium falciparum*). Caracterización de nuevos derivados químicos con actividad antimalárica: 4(1H)-piridonas. Universidad Autónoma de Madrid. Año 2015

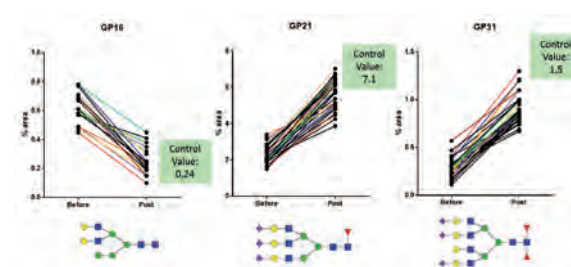


Figura 2. Identificación de marcadores de eficacia terapéutica (marcador de cura) para la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Se muestran el contenido relativo de ciertos GPs (y su estructura) en los mismos pacientes de fase aguda de la enfermedad de Chagas, antes y después (24 meses) del tratamiento quimioterapéutico con Benznidazol. Valores control hacen referencia al contenido relativo de cada GP en sujetos sanos.

Figure 2. Identification of therapeutic efficacy (cure) markers for Chagas Disease. Shown are the relative sera content of selected GPs (and its structure) in the same acute phase Chagas Disease patients before and after chemotherapeutic treatment (24 months) with Benznidazole. Control value refers to the value of healthy control patients.

Interacciones funcionales entre tetraspaninas y moléculas de adhesión

Functional interactions between tetraspanins and cell adhesion molecules



Jefe de Línea / *Group Leader:*

Carlos Cabañas Gutiérrez

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*

Raquel Reyes Manzanas

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Yesenia Machado Pineda

Beatriz Cardeñes Pérez

Resumen de investigación

La tetraspanina CD9 interacciona con numerosas proteínas de la superficie celular, incluyendo diversas moléculas de adhesión, y a través de estas interacciones regula procesos celulares cruciales como la adhesión, migración, invasión y proliferación. Diversos estudios han descrito una interacción funcional de CD9 con varios miembros de las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 3$ de integrinas en numerosos tipos celulares, de manera que la supresión o sobre-expresión de CD9, así como el tratamiento con anticuerpos monoclonales específicos frente a esta tetraspanina son capaces de afectar y regular la adhesión, migración y señalización celular dependiente de las integrinas asociadas. Sin embargo, no había sido descrita la interacción de esta tetraspanina con ningún miembro de la familia $\beta 2$ de integrinas leucocitarias. Nosotros hemos estudiado la interacción funcional entre CD9 y la integrina $\beta 2$ LFA-1 en leucocitos. Mediante el empleo de microscopía confocal (Figura 1) y experimentos de co-inmunoprecipitación demostramos que CD9 se asocia a LFA-1 en diferentes tipos de células leucocitarias (linfocitos T y B y células monocíticas). Esta asociación se mantenía tras las solubilización celular con detergentes de elevada fortaleza, lo cual, junto con experimentos de entrecruzamiento químico, ensayos de ligamiento por proximidad (PLA) y de arrastre molecular ("pull down") nos permitió concluir que dichas interacciones moleculares eran de tipo directo ("de orden primario") y estaban medidas por el dominio LEL de CD9. A través de estas interacciones, CD9 inhibe la función adhesiva de la integrina LFA-1 y la actividad de linfocitos citotóxicos mediada por esta integrina. Los mecanismos responsables de esta regulación negativa no implican cambios de la afinidad intrínseca de LFA-1 sino más bien cambios en su estado de agregación molecular, que regulan su avidéz por ligandos y están resumidos en el modelo representado en la Figura 2.

Recientemente, también hemos comenzado a estudiar el papel funcional de diversas moléculas de adhesión que son miembros de las superfamilias de las integrinas y de las inmunoglobulinas, y también de metaloproteinasas como ADAM17, en los exosomas de origen tumoral.

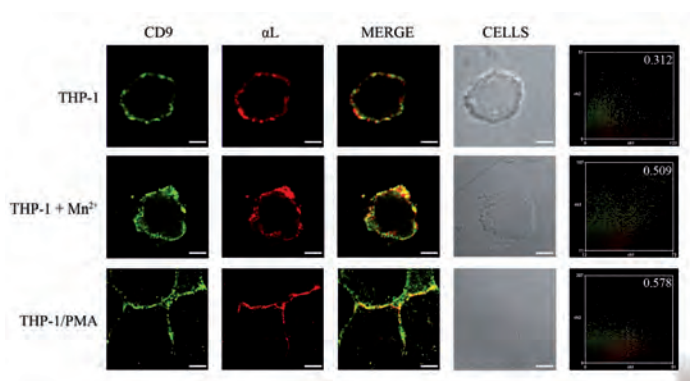


Figura 1. CD9 co-localiza con la integrina leucocitaria LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) en la superficie de las células monocíticas THP-1.

Imágenes de microscopía confocal de las células THP-1, THP-1 tratadas con 0,4 mM Mn^{2+} y células THP-1 diferenciadas hacia macrófagos con el éster de forbol PMA (THP-1/PMA) mostrando la co-localización de CD9 (en verde) y la subunidad αL de la integrina (en rojo) en la superficie celular. Se muestran imágenes representativas de secciones confocales para cada canal (verde y rojo) y la superposición de canales, junto con una imagen de contraste de fases y los histogramas (paneles de la derecha) con los valores de co-localización de Pearson. Barras de escala = 5 μm .

Figure 1. CD9 co-localizes with the leukocyte integrin LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) on the surface of monocytic THP-1 cells.

Confocal microscopy of THP-1, THP-1 in the presence of 0.4 mM Mn^{2+} and THP-1/PMA-differentiated cells showing co-localization of CD9 (green) and αL (red) at the cell surface. Representative images of confocal sections for each channel (green and red) and merged channels are shown together with histograms (right panels) showing Pearson co-localization values. Scale bars = 5 μm .

Research summary

The tetraspanin CD9 interacts with numerous cell surface proteins, including several adhesion molecules, and regulates through these interactions crucial cellular processes such as adhesion, migration, invasion and proliferation. Several reports have demonstrated a functional interaction between CD9 and different members of the $\beta 1$ and $\beta 3$ subfamilies of integrins in a number of cell types. Therefore, knocking-down or overexpressing CD9, and treatment with monoclonal antibodies specific for this tetraspanin, were able to alter and regulate the processes of cell adhesion, migration and signaling, which are all dependent on the associated integrins. However, the interaction of CD9 with any member of the $\beta 2$ subfamily of leukocyte integrins had not been reported. We have studied the interaction of CD9 with the $\beta 2$ integrin LFA-1 on leukocytes. Based on confocal microscopy colocalization (Figure 1) and on co-immunoprecipitation results, we have demonstrated that CD9 associates with LFA-1 in different types of leukocytes including T, B and monocytic cells. This association is resistant to stringent solubilization conditions which, together with data from chemical crosslinking, in situ Proximity Ligation Assays, and pull-down experiments, allowed us to conclude that the association between CD9 and LFA-1 corresponds to a primary/direct type of interaction that is mediated through the Large Extracellular Loop (LEL) of CD9. CD9 exerts inhibitory effects on the adhesive function of LFA-1 and on LFA-1-dependent leukocyte cytotoxic activity. The mechanism responsible for this negative regulation exerted by CD9 on LFA-1 adhesion does not involve changes in the intrinsic affinity of this integrin but seems to be related to alterations in its state of molecular aggregation, which in turn regulate its avidity, as summarized in the model depicted in Figure 2.

Recently, we have also started to study the functional role of different cell adhesion molecules of the integrin and immunoglobulin superfamilies, and the ADAM17 metalloproteinase, that are present on the surface of tumor-derived exosomes.

Publicaciones / Publications

Reyes R, Monjas A, Yáñez-Mó M, Cardeñes B, Morlino G, Gilsanz A, Machado Y, Lafuente E, Monk P, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. (2015). Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9. *Biochimica et Biophysica Acta* **1853**:2464-80.

Dios-Esponera A, Isern-de-Val S, Sevilla-Movilla S, García-Verdugo R, García-Bernal D, Arellano-Sánchez N, Cabañas C and Teixidó J. (2015). Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4 \beta 1$. *Molecular Biology of the Cell* **26**:3215-28.

Schläger C, Körner H, Vidoli S, Brylla E, Haberl M, Krüger M, Cabañas C, Issekutz T, Nelson PJ, Bechmann I, Lodygin D, Odoardi F and Flügel A. (2016). Effector T cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid and its control by T cell activation- and CCR5/CXCR3-triggered VLA-4/LFA-1 adhesion forces. *Nature* **530**:349-53.

Yang Su, Wei Xia, Jing Li, Thomas Walz, Martin J. Humphries, Dietmar Vestweber, Carlos Cabañas, Chafen Lu, Timothy A. Springer (2016). Relation of Conformation to Function in Integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Proc Natl Acad Sci USA*. **113**:E3872-81.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Raquel Reyes Manzananas (Ftad. Ciencias, UAM). "La tetraspanina CD9 regula la capacidad adhesiva de la integrina leucocitaria LFA-1". Enero, 2016. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

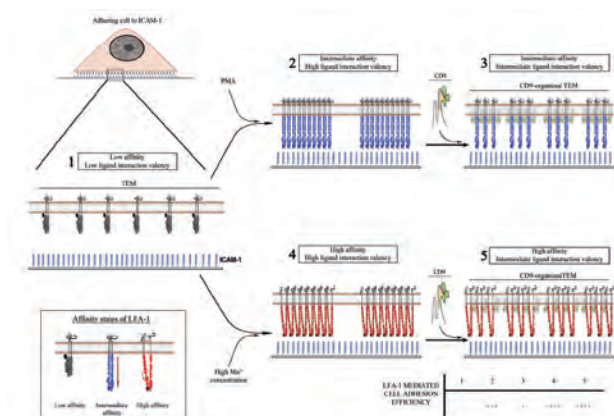


Figura 2. Modelo que resume la regulación por CD9 de la afinidad y valencia de interacción (avidéz) con el ligando que caracterizan los diferentes estados funcionales de la integrina leucocitaria LFA-1 ($\alpha L \beta 2$).

Figure 2. Model which summarizes the regulation by the tetraspanin CD9 of the ligand affinity and interaction valency (avidity) characterizing the distinct functional states of the leukocyte integrin LFA-1 ($\alpha L \beta 2$).

Fisiopatología mitocondrial

Mitochondrial pathophysiology



Jefe de Línea / Group Leader:
Susana Cadenas Álvarez

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Patricia Sánchez Pérez
Rubén Juvera Pérez

Estudiantes / Undergraduate Students:
Alicia Villacampa Calvo
Rosa Luque Gracia
Jesús Guillén Reyes
Irene Álvarez Guerra

Resumen de investigación

Nuestro objetivo es entender la función de las mitocondrias en el desarrollo de estados patológicos, especialmente aquellos en los que subyace el estrés oxidativo. La función fisiológica de la proteína desacoplante mitocondrial UCP3 no está claramente establecida, aunque un número creciente de evidencias experimentales indican que podría desempeñar un papel en el control de la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno y en la protección frente al daño oxidativo. Una respuesta eficiente frente al estrés oxidativo es esencial para la supervivencia celular. En este sentido, el factor de transcripción Nrf2 juega un papel esencial en la inducción coordinada de genes que codifican diversos antioxidantes y enzimas detoxificantes de fase II, que colectivamente contribuyen a su actividad citoprotectora. Nrf2 es activado por diversos inductores, entre los que se encuentra el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), un producto de la peroxidación lipídica considerado como un inductor y mediador del estrés oxidativo. Además, el HNE es capaz de activar a las proteínas desacoplantes (UCPs).

Durante este periodo, nuestros estudios se han centrado fundamentalmente en la regulación de la expresión y la función de UCP3 en respuesta al HNE, así como en la posible implicación de Nrf2 en este proceso. Hemos encontrado que el tratamiento de cardiomiocitos de ratón con dosis subletales de HNE induce la expresión de UCP3. Este efecto está mediado por el factor de transcripción Nrf2 y promueve la supervivencia celular tras el tratamiento con HNE. Además, hemos mostrado que el HNE altera en gran medida la bioenergética de los cardiomiocitos, aumentando la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna y reduciendo drásticamente la capacidad respiratoria máxima y la capacidad de reserva respiratoria. Estos resultados sugieren que la regulación de UCP3 mediada por Nrf2 en respuesta al HNE podría ser importante para la protección del corazón en condiciones de estrés oxidativo como la isquemia-reperfusión.

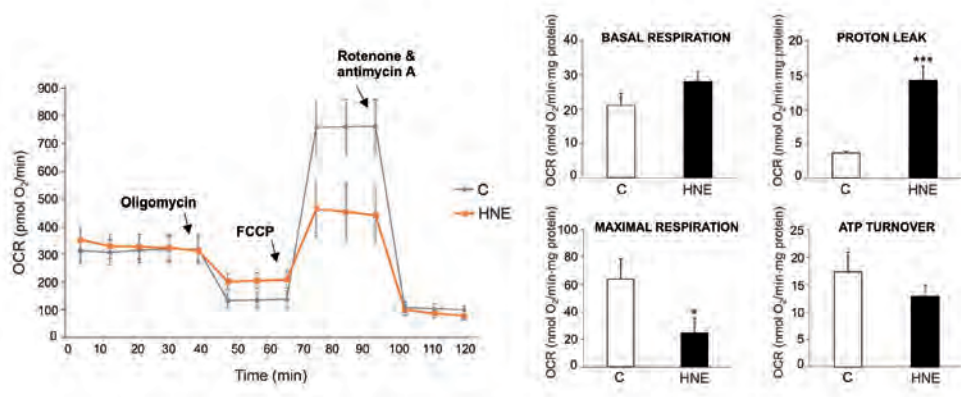


Figura 1. El tratamiento con HNE altera en gran medida la bioenergética de los cardiomiocitos. C, control; HNE, 4-hidroxi-2-nonenal; OCR, tasa de consumo de oxígeno.

Figure 1. The treatment with HNE greatly alters cardiomyocyte bioenergetics. C, control; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; OCR, oxygen consumption rate.

Research summary

We aim to understand the role of mitochondria in the development of pathological conditions, especially those in which oxidative stress is involved. The physiological function of mitochondrial uncoupling protein UCP3 is not clearly established, although a growing number of experimental evidence suggests that it may play a role in the control of the production of mitochondrial reactive oxygen species and in the protection against oxidative damage. An efficient response to oxidative stress is essential for cell survival. In this sense, the transcription factor Nrf2 plays an essential role in the coordinated induction of genes encoding various antioxidant and phase II detoxifying enzymes, which collectively contribute to its cytoprotective activity. Nrf2 is activated by various inducers, including 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a product of lipid peroxidation considered as an inducer and mediator of oxidative stress. In addition, HNE is able to activate uncoupling proteins (UCPs).

During this period, our studies have mainly focused on the regulation of UCP3 expression and function in response to HNE, as well as on the possible involvement of Nrf2 in this process. We have found that the treatment of mouse cardiomyocytes with sublethal doses of HNE induces the expression of UCP3. This effect is mediated by the transcription factor Nrf2 and promotes cell survival after the treatment with HNE. In addition, we have shown that HNE greatly alters the bioenergetics of cardiomyocytes, increasing proton leakage through the internal mitochondrial membrane and drastically reducing maximal respiratory capacity and respiratory reserve capacity. These results suggest that the Nrf2-mediated regulation of UCP3 in response to HNE may be important in protecting the heart under conditions of oxidative stress such as ischemia-reperfusion.

Publicaciones / Publications

García-Casarrubios, E., De Moura, C., Arroba, A.I., Pescador, N., Calderón-Domínguez, M., García, L., Herrero, L., Serra, D., Cadenas, S., Reis, F., Carvalho, E., Obregón, M.J. and Valverde, A.M. (2016) Rapamycin negatively impacts insulin signaling, glucose uptake and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 1929-1941.

Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., Fernández-Vizarra, E., Cadenas, S., Delmiro, A., García-Consuegra, I., Arenas, J., Martín, M.A., Larsson, N.G. and Ugalde, C. (2016) COX7A2L is a mitochondrial complex III binding protein that stabilizes the III2+IV supercomplex without affecting respirasome formation. *Cell Rep.* **16**, 2387-2398.

López-Bernardo, E., Anedda, A., Sánchez-Pérez, P., Acosta-Iborra, B. and Cadenas, S. (2015) 4-Hydroxynonenal induces Nrf2-mediated UCP3 upregulation in mouse cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 427-438.

Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S. and Lamas, S. (2015) Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **6**, 183-197.

Martínez-deMena, R., Anedda, A., Cadenas, S. and Obregón, M.J. (2015) TSH effects on thermogenesis in rat brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **404**, 151-158.

Marín-Buena, L., García-Bartolomé, A., Morán, M., López-Bernardo, E., Cadenas, S., Hidalgo, B., Sánchez, R., Séneca, S., Arenas, J., Martín, M.A. and Ugalde, C. (2015) Differential proteomic profiling unveils new molecular mechanisms associated with mitochondrial complex III deficiency. *J. Proteomics* **113**, 38-56.

Otras actividades / Other activities

Nuestro grupo forma parte del "Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa". <http://www.iis-princesa.org>

Our group belongs to the "Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa". <http://www.iis-princesa.org>

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elia López Bernardo (2015). Regulation of the expression and function of mitochondrial uncoupling protein UCP3 in response to oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2 and implications in cardiac ischemia-reperfusion. Universidad Autónoma de Madrid. Directora: Susana Cadenas Álvarez. Mención de Doctorado Internacional.

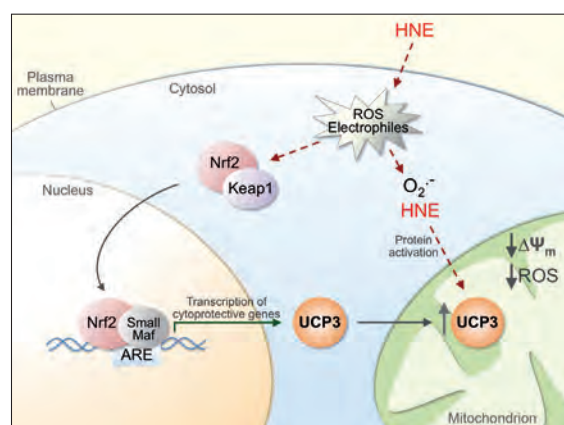
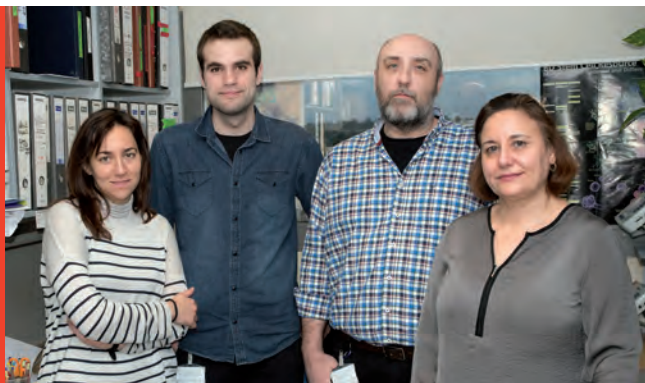


Figura 2. Dosis subletales de HNE aumentan la expresión de UCP3 vía Nrf2, lo que promueve la supervivencia de los cardiomiocitos.

Figure 2. Sublethal doses of HNE increase UCP3 expression via Nrf2, which promotes the survival of cardiomyocytes.

Plasticidad Celular en Desarrollo y Cáncer

Cellular Plasticity in Development and Cancer



Jefe de Línea / Group Leader:
César Coboleda Hernández

Personal Científico / Scientific Staff:
Isabel Rodríguez Enríquez

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Elena Campos Sánchez

Estudiantes / Undergraduate Students:
David Fernández Moreno
Adrián Sanvicente García
Jorge Martínez Caro

Resumen de investigación

En nuestro grupo estudiamos la plasticidad celular dentro del sistema hematopoyético y su modulación en condiciones patológicas (cáncer y síndromes del desarrollo), usando modelos de ratón modificados genéticamente (GEMMs) en los que regulamos los niveles y las ventanas de expresión de modificadores epigenéticos y factores de transcripción, normales u oncogénicos.

La hipótesis de las células madre tumorales (CSCs) sugiere que la información oncogénica sólo necesita estar realmente en dichas CSCs. Así, hemos generado GEMMs que expresan, en sus células madre hematopoyéticas, la lesión oncogénica iniciadora de las leucemias linfoblásticas agudas infantiles de precursores B (pB-ALLs), y hemos estudiado el papel que la exposición a diferentes eventos (campos electromagnéticos, otras alteraciones genéticas, infecciones) tiene en el desarrollo de las pB-ALLs, demostrando que la exposición a infecciones es uno de los factores causales de las mismas.

El Síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) está causado por una delección en el cromosoma 4. Los afectados presentan numerosos problemas, entre ellos inmunodeficiencias. Uno de los genes delecionados es *WHS-Candidate-1 (WHSC1)*, un regulador epigenético que participa en la reparación del daño al ADN y cuya sobreexpresión también está implicada en mieloma múltiple y en pB-ALLs. Estamos estudiando el exoma de pacientes con WHS, para determinar si acumulan daño en el ADN debido a la pérdida parcial de *WHSC1*, lo que podría hacer que fuesen más susceptibles a desarrollar tumores. Hemos caracterizado el desarrollo hematopoyético y la función inmune en ratones *knockout para Whsc1*, y disponemos así de un modelo que recapitula las características de la inmunodeficiencia de los pacientes. De esta manera, combinando el estudio de muestras de pacientes humanos con el de modelos animales avanzados, esperamos poder identificar los mecanismos moleculares de las alteraciones inmunes y de otros tipos descritas en los pacientes. Esto permitiría mejorar la calidad de la asistencia médica a los pacientes de WHS y conocer su susceptibilidad al daño genético.

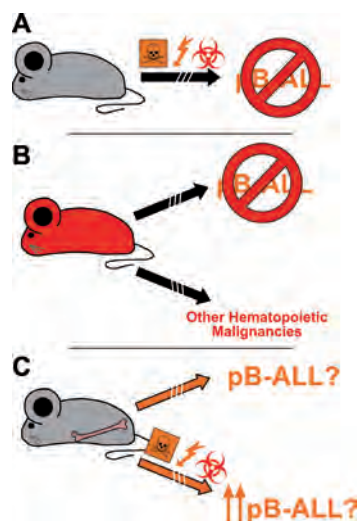


Figura 1. CARACTERÍSTICAS DESEABLES EN LOS MODELOS DE RATÓN DE pB-ALL. (A) Los animales WT, cuando se exponen a agentes ambientales, no desarrollan pB-ALL como las humanas. (B) Los modelos modificados genéticamente (GEMMs) usados habitualmente, y que no tienen en cuenta la célula de origen de las pB-ALL humanas, no desarrollan pB-ALL similares a las humanas, aunque pueden generar otros tipos de tumores hematopoyéticos. (C) La generación de GEMMs que desarrollen una pB-ALL como la humana requiere tener en cuenta la naturaleza de la célula de origen de la leucemia en niños (casi con seguridad en la médula ósea) y el hecho de que las leucemias surgen de unas pocas células en el contexto de un tejido normal. Estos animales pueden desarrollar pB-ALL similar a la humana, y se puede incrementar la incidencia, la patogenicidad o la velocidad de desarrollo de la pB-ALL en presencia de agentes que sean realmente capaces de inducir leucemia.

Figure 1. DESIRED CHARACTERISTICS FOR AN IDEAL pB-ALL GEMM. (A) When exposed to environmental agents, WT mice do not develop human-like spontaneous pB-ALLs. (B) Conventional GEMMs that do not take into account the human pB-ALL cell-of-origin fail to generate human-like pB-ALL, although they give rise to different types of haematopoietic malignancies. (C) The successful generation of GEMMs developing human-like pB-ALL requires taking into account the nature of the leukemic cell-of-origin in humans (most likely in the bone marrow), and to consider that leukemias arise from a few cells in the context of a normal tissue. These mice might develop human-like pB-ALL, and the incidence, onset or pathogenicity of the disease should increase in the presence of any real leukemia-inducing environmental agent.

Research summary

Research in our group is focused on the study of cellular plasticity in the hematopoietic system and how it is controlled in pathological conditions (cancer and developmental syndromes). As experimental tool we use genetically engineered mouse models (GEMMs) in which we modify the levels and windows of expression of transcription factors and epigenetic regulators, either normal or oncogenic.

The cancer stem cell (CSC) model suggests that the genetic information responsible for tumor generation might only be required at the level of these CSCs. We have generated GEMMs expressing, in their hematopoietic stem cells, the oncogenic lesion responsible for the initiation of childhood precursor B acute lymphoblastic leukemias (pB-ALLs). With these models, we are studying the role that the exposure to different agents (electromagnetic fields, other genetic lesions, infections) might play in the development of pB-ALLs, and we have demonstrated that exposure to infections can be one of the triggering factors.

Wolf Hirschhorn Syndrome (WHS) is caused by a deletion in chromosome 4. WHS patients present many severe problems, including immunodeficiencies. One of the deleted genes is WHS-Candidate 1 (WHSC1), an epigenetic regulator involved in DNA damage repair and whose overexpression is also implicated in multiple myeloma and pB-ALL. We are studying the exome of WHS patients to try and determine if they accumulate DNA damage as a consequence of the partial loss of WHSC1, which could make them more susceptible to tumor development. We have characterized hematopoietic development and immune function in *Whsc1* knockout mice, and therefore we have a new model recapitulating patient's immunodeficiencies. In this way, combining the study of human patient samples with the data from advanced mouse models, we hope to identify the molecular mechanisms behind the alterations affecting WHS patients. This would allow us to improve their medical attention and to have a prognostic capacity regarding their potential susceptibility to genetic damage.

Publicaciones / Publications

Robles EF, Mena-Varas M, Barrio L, Merino-Cortes SV, Balogh P, Du MQ, Akasaka T, Parker A, Roa S, Panizo C, Martin-Guerrero I, Siebert R, Segura V, Agirre X, Macri-Pellizeri L, Aldaz B, Vilas-Zorano A, Zhang S, Moody S, Calasanz MJ, Tousseyn T, Broccardo C, Brousset P, Campos-Sanchez E, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I, Fernandez-Luna JL, Garcia-Muñoz R, Pena E, Bellosillo B, Salar A, Baptista MJ, Hernandez-Rivas JM, Gonzalez M, Terol MJ, Climent J, Ferrandez A, Sagaert X, Melnick AM, Prosper F, Oscier DG, Carrasco YR, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. (2016) Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. *Nat Commun.* 7:11889.

Gong Y, Capstick M, Dasenbrock C, Fedrowitz M, Cobaleda C, Sánchez-García I, Kuster N. (2016) Comparative dosimetry for children and rodents exposed to extremely low-frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 37:310-322.

Schüz J, Dasenbrock C, Ravazzani P, Röösli M, Schär P, Bounds PL, Erdmann F, Borkhardt A, Cobaleda C, Fedrowitz M, Hamnerius Y, Sanchez-Garcia I, Seger R, Schmiegelow K, Ziegelberger G, Capstick M, Manser M, Müller M, Schmid CD, Schürmann D, Struchen B, Kuster N. (2016) Extremely low-frequency magnetic fields and risk of childhood leukemia: A risk assessment by the ARIMMORA consortium. *Bioelectromagnetics* 37: 183-189.

Auer F, Ingenhag D, Bhatia S, Enczmann J, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I, Borkhardt A, Hauer J. (2016) GEMMs addressing Pax5 loss-of-function in childhood pB-ALL. *Eur J Med Genet.* 59:166-172.

Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, Auer F, González-Herrero I, García-Ramírez I, Ginzler S, Thiele R, Constantinescu SN, Bartenhagen C, Dugas M, Gombert M, Schäfer D, Blanco O, Mayado A, Orfao A, Alonso-López D, Rivas Jde L, Cobaleda C, García-Cenador MB, García-Criado FJ, Sánchez-García I, Borkhardt A. (2015) Infection Exposure is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer Discov.* 5:1328-1343.

Otras actividades / Other activities

Premio FEDER 2015 a la Investigación en Enfermedades Raras, concedido por la Federación Española de Enfermedades Raras.

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.

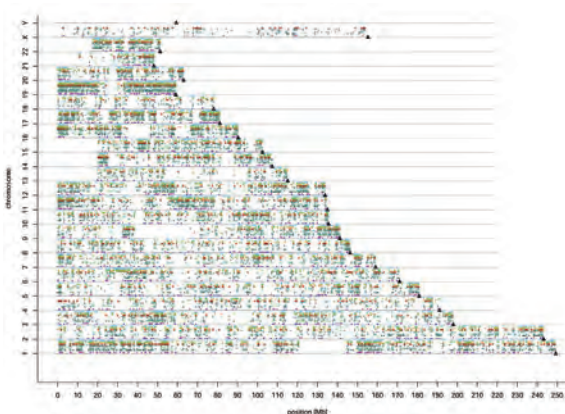


Figura 2. VARIANTES PRIVADAS IDENTIFICADAS EN LA SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE PACIENTES CON SÍNDROME DE WOLF-HIRSCHHORN. Se muestran las variantes "privadas" (con frecuencia poblacional baja y con genotipo 0/1) para los pacientes estudiados, con sus respectivas localizaciones a lo largo del genoma.

Figure 2. PRIVATE VARIANTS IDENTIFIED IN THE ANALYSIS OF THE EXOMES OF WOLF-HIRSCHHORN SYNDROME PATIENTS. Private variants (with low population frequency and 0/1 genotype) for the analysed patients, plotted along the chromosomes.

Interacción entre el citoesqueleto y la membrana plasmática

Cytoskeleton-plasma membrane interactions



Jefe de Línea / Group Leader:
Isabel Correas Hornero

Personal Científico / Scientific Staff:
Carlos M. Luque González

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Laura Rangel Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Catalina López Gutiérrez
María Quintana Romero

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, la división o el transporte vesicular e intracelular.

La familia de las proteínas 4.1 - 4.1R, 4.1B, 4.1N y 4.1G - conecta el citoesqueleto subcortical con la membrana plasmática a través de sus dominios FERM (four-point-one, ezrin-radixin-moesin) y desempeña también funciones menos caracterizadas en otros sitios de la célula. Nuestro grupo está interesado en dilucidar nuevas funciones celulares de 4.1R y en identificar los mecanismos moleculares generadores de la gran diversidad de isoformas de 4.1.

Durante 2015-2016 hemos caracterizado un nuevo grupo de transcritos cortos de 4.1 que contribuyen a generar diversidad de esta proteína ya que codifican para isoformas que carecen del extremo C-terminal característico de las 4.1 prototípicas. Estos transcritos cortos se expresan en menor proporción que los transcritos largos y se originan mediante un mecanismo de poliadenilación alternativa que opera para los cuatro genes de 4.1 humano de forma dependiente de tejido (RNA Biol., epub ahead Diciembre 2016). Además durante este mismo periodo, hemos realizado estudios funcionales mediante experimentos de interferencia con siRNAs de 4.1R prototípica, microscopía confocal y análisis proteómico que sugieren que la proteína 4.1R participa en los pasos finales de la citocinesis, probablemente en la abscisión. Estamos profundizando estos estudios con el fin de entender el papel que 4.1R desempeña en este proceso. De manera complementaria seguimos llevando a cabo estudios funcionales sobre Coracle (Cora), la única proteína ortóloga de la familia 4.1 presente en *Drosophila melanogaster*. Resultados preliminares indican que la falta de 4.1/Cora provoca muerte celular, acompañada del procesamiento proteolítico de la caspasa efectora Death caspase-1 (Dcp-1). 4.1/Cora podría, por tanto, ser un factor que impide la entrada de las células en apoptosis, a través de un mecanismo aún por esclarecer.

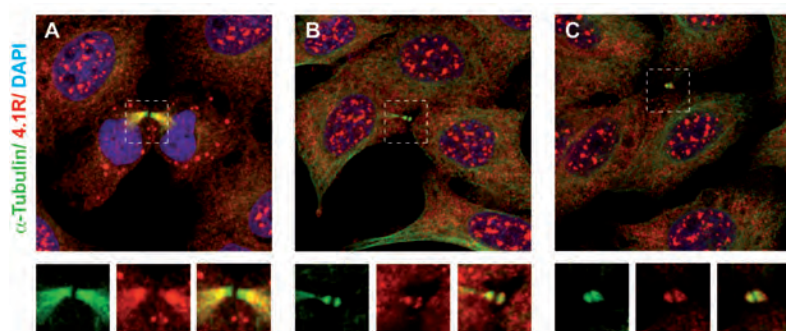


Figura 1. La proteína 4.1R se concentra en el cuerpo medio durante la citocinesis. Se muestran tres etapas del proceso de formación y corte del cuerpo medio que separa dos células en división y la acumulación de 4.1R, (A) en el puente intercelular, (B) en el cuerpo medio o de Flemming y (C) en el remanente del cuerpo medio tras la separación de las dos células hijas.

Figure 1. Protein 4.1R concentrates at the midbody during cytokinesis. The figure shows three stages of the cytokinesis process and the accumulation of protein 4.1R at, (A) the intercellular bridge, (B) the midbody or Flemming body and (C) the midbody remnant once the two daughter cells are completely separated.

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 focused our attention on the 4.1 family of proteins - 4.1R, 4.1B, 4.1N y 4.1G - which connect subcortical cytoskeleton to lipids and membranes through FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) domains. In addition, we are studying the mechanisms involved in the generation of protein 4.1 diversity.

*During 2015-2016, we have studied a new group of human 4.1 mRNAs that originate by alternative polyadenylation and lack the exons encoding the C-terminal region of prototypical 4.1 proteins, thereby encoding a new type of 4.1 proteins. Alternative polyadenylation functions for the four human paralogous genes of 4.1 in a tissue-dependent manner. Comparative genomic analyses indicate that alternative polyadenylation is conserved in various mammals (RNA Biol., epub ahead Diciembre 2016). Additional work carried out in this period using siRNAs interference assays, confocal microscopy and proteomic analyses indicates that protein 4.1R participates in cytokinesis, most probably at the abscission process. We are currently investigating the actual role of 4.1R in this process. We have also continued with the functional characterization of Coracle (Cora), the only 4.1 family ortholog protein present in *Drosophila melanogaster*. Preliminary results show that loss of 4.1/Cora causes cell-death and proteolytic processing of effector caspase Death caspase-1 (Dcp-1). Hence, 4.1/Cora could play an anti-apoptotic role through a mechanism that is yet to be characterized.*

Publicaciones / Publications

Bernabé-Rubio M, Andrés G, Casares-Arias J, Fernández-Barrera J, Rangel L, Reglero-Real N, Gershlick DC, Fernández JJ, Millán J, Correas I, Miguez DG, Alonso MA. (2016) Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* **214**, 259-73.

Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón E, Reglero-Real N, Fernández-Martín L, Durán MC, Alonso MA, Correas I, Cox S, Ridley AJ, Millán J. (2016) RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* **213**, 385-402.

Reales, E., Bernabé-Rubio, M., Casares-Arias, J., Rentero, C., Fernández-Barrera, J., Rangel, L., Correas, I., Enrich, C., Andrés, G. and Alonso, M. A. (2015) The MAL protein regulates membrane condensation at the ciliary base required for primary cilium elongation. *J. Cell Sci.* **128**, 2261-2270.

Otras actividades / Other activities

Isabel Correas. Miembro de la Comisión de Acreditación de Catedráticos de Universidad, área de Salud, de la ANECA (2014-2016).

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Laura Formentini
Lucía González Llorente
Fulvio Santacatterina
María Sánchez-Aragó
Noelia Blanco Talaván
Lucía García Ledo
Beatriz Soldevilla Navarro

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Pau Bernat Esparza Moltó
Cristina Nuevo Tapióles
Laura Torresano Cicuendez
Carmen Cuevas-Martín
Javier García Bermúdez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Margarita Chamorro Bello
Cristina Núñez de Arenas Flores
Estefanía Martínez Jover
(Project Manager)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Beatriz Gil Martí
Sophie J. Fitch

Científicos visitantes /
Visiting Scientists:
Marek Halenár
(Slovak Republic)
Daniel Sypniewski
(Poland)

Resumen de investigación

La mitocondria desempeña un papel fundamental en el metabolismo, la ejecución de la muerte celular y en la señalización intracelular para la correcta fisiología de la célula. Por la relevancia de sus funciones, las alteraciones de la actividad mitocondrial están implicadas en la génesis y progresión del envejecimiento así como de un gran número de patologías que incluyen el cáncer y la neurodegeneración. La ATP sintasa de la mitocondria es un componente esencial para la transducción de energía biológica y de la señalización, en la organización de las crestas y para la ejecución de la muerte. Hemos descrito que la expresión de la ATP sintasa está parcialmente reprimida en carcinomas humanos aportando una “huella bioenergética” de gran valor para evaluar la progresión de la enfermedad. Más recientemente, hemos descrito que su inhibidor, “ATPase Inhibitory Factor 1” (IF1), está muy sobre-expresado en carcinomas y demostrado que juega un papel relevante en la reprogramación metabólica de la célula tumoral y durante la diferenciación de células madre. Además, la inhibición de la ATP sintasa mediada por IF1 genera una señal de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueve la activación de programas nucleares encaminados a la supervivencia celular. Hemos desarrollado ratones transgénicos que expresan de manera condicional IF1 humano en neuronas, hepatocitos, epitelio intestinal o corazón y demostrado *in vivo* el papel fundamental de IF1 en la reprogramación metabólica y en la señalización de respuestas “mitohorméticas”, incluyendo los mecanismos por los que IF1 promueve un fenotipo pro-oncogénico en el hígado (Fig.1). Además, hemos generado el ratón *ATP1F1^{lox/lox}* para el desarrollo de IF1-KO en diferentes tejidos y demostrado que la unión de IF1 a la ATP sintasa, lo que promueve la inhibición de la enzima en hipoxia, ciclo celular y en cáncer, está regulada por la actividad de una proteína quinasa cAMP-dependiente (Fig. 2). Es decir, IF1 es una proteína muy relevante que define el fenotipo celular. Nuestro objetivo fundamental es profundizar en el conocimiento de la biología celular de IF1 y de su implicación en cáncer, función neuronal y en envejecimiento.

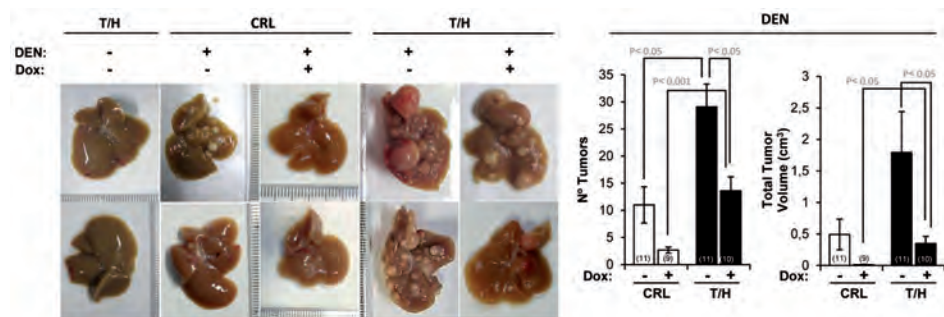


Figura 1. La sobre-expresión de IF1 humano en hígado de ratón aumenta la hepatocarcinogénesis inducida por DEN. (Tomado de Oncotarget (2016) 7,490-508).

Figure 1. The overexpression of human IF1 in mouse liver increased DEN-induced hepatocarcinogenesis (Taken from Oncotarget (2016) 7,490-508).

Research summary

Mitochondria play key roles in metabolism, the execution of cell death and intracellular signaling. Consistent with the prime physiological roles of mitochondria, its dysfunction is involved in the genesis and progression of ageing and of a plethora of pathologies including cancer and neurodegeneration. The mitochondrial ATP synthase is a key transducer in energy conservation and in signaling, in shaping the structure of cristae and in the execution of death. Previously, we have documented that the expression of the ATP synthase is partially repressed in human carcinomas providing a "bioenergetic signature" of disease progression. More recently, we have described that its inhibitor, the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1), is highly overexpressed in most prevalent carcinomas and demonstrated that it plays a prominent role in metabolic reprogramming of tumor cells and during differentiation of stem cells. Moreover, the IF1-mediated inhibition of the ATP synthase triggers a ROS signal that promotes the activation of nuclear programs aimed at cell survival. We have developed transgenic mice that conditionally express IF1 in neurons, hepatocytes, intestinal epithelium or heart and demonstrated in vivo the role of IF1 in metabolic reprogramming and signaling "mitohormetic" responses to the nucleus including the mechanisms by which IF1 overexpression promotes a pro-oncogenic phenotype in liver (Fig. 1). Furthermore, we have succeeded in the generation of the *ATPIF1^{lox/lox}* mice for the development of IF1-KO models in different tissues and demonstrated that the binding of IF1 to the ATP synthase, which promotes the inhibition of the enzyme in hypoxia, cell cycle and in cancer, is regulated by the activity of a mitochondrial cAMP-dependent protein kinase (Fig. 2). Hence, IF1 is a most relevant mitochondrial protein that defines the cellular phenotype. Our main objective is to deepen into the knowledge of the cellular biology of IF1 and of its implication in cancer, neuronal function and in ageing.

Publicaciones / Publications

Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Cuevas-Martín C, Guenzel A, Pérez B, Barry MA, Murphy MP, Logan A, Gonzalez-Quintana A, Martín MA, Medina S, Gil-Izquierdo A, Cuezva JM, Richard E, Desviat LR. (2016) In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder. *Free Radic Biol Med*. **96**, 1-12.

García-Bermúdez J, Cuezva JM. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. (2016) *Biochim Biophys Acta* **1857**, 1167-1182.

Klionsky DJ,Cuezva JM,et al., (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1-222.

Cascado MV, Abdelmohsen K, Noh JH, Fernández-Ayala DJ, Willers IM, Brea G, López-Lluch G, Valenzuela-Villatoro M, Cuezva JM, Gorospe M, Siendones E, Navas, P. (2016) RNA-binding proteins regulate cell respiration and coenzyme Q biosynthesis by post-transcriptional regulation of COQ7. *RNA Biol*. **13**, 622-634.

Santacatterina F, Sánchez-Cenizo L, Formentini L, Mobasher MA, Casas E, Rueda CB, Martínez-Reyes I, Núñez de Arenas C, García-Bermúdez J, Zapata JM, Sánchez-Aragó M, Satrustegui J, Valverde AM, Cuezva JM. (2016) Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state. *Oncotarget* **7**, 490-508.

García-Bermúdez J, Nuevo-Tapióles, C. and Cuezva, J. M. (2016). Determination of the H⁺-ATP Synthase and Hydrolytic Activities. *Bio-protocol* **6**: e1905.

García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles, C, Cuezva JM. (2015) PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase. *Cell Rep*. **12**, 2143-2155.

Martínez-Fernández de la Cámara C, Hernández-Pinto AM, Olivares-González L, Cuevas-Martín C, Sánchez-Aragó M, Hervás D, Salom D, Cuezva JM, de la Rosa EJ, Millán JM, Rodrigo R. (2015) Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration. *Sci Rep*. **5**, 11764.

Santacatterina F, Chamorro M, de Arenas CN, Navarro C, Martín MA, Cuezva JM, Sánchez-Aragó M. (2015) Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases. *J Transl Med*. **13**, 65.

Barneo-Muñoz M, Juárez P, Civera-Tregón A, Yndriago L, Pla-Martín D, Zenker J, Cuevas-Martín C, Estela A, Sánchez-Aragó M, Forteza-Vila J, Cuezva JM, Chrast R, Palau F. (2015) Lack of GADP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet*. **11**, e1005115.

Linares CI, Ferrín G, Aguilar-Melero P, González-Rubio S, Rodríguez-Perálvarez M, Sánchez-Aragó M, Chicano-Gálvez E, Cuezva JM, Montero-Álvarez JL, Muntané J, de la Mata M. (2015) Sensitivity to anti-Fas is independent of increased cathepsin D activity and adrenodoxin reductase expression occurring in NOS-3 overexpressing HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*. **1853**, 1182-1194.

Martínez-Reyes, Cuezva, J.M. (2015) The relevance of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer biology. In: Mazurek, S. and M. Shoshan, M. (ed) "Tumor Cell Metabolism: Pathways, Regulation and Biology". Springer Verlag, pp. 233-256.

Otras actividades / Other activities

(i) We are Unit 713 of CIBERER, in the field of Mitochondrial Pathology of the CIBER de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III.

(ii) We are the Research Group leading "Translation of Energy Metabolism" in the field of Cancer of the Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12).

(iii) We have coordinated the MITOLAB Consortium of the Comunidad de Madrid.

(iv) Organized de "MITOLAB Closing Meeting" of the Madrid I+D Program, 12-13/11/2015.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Javier García Bermúdez. 2015. "Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria" Universidad Autónoma de Madrid. Directores: José M. Cuezva and María Sánchez-Aragó. Sobresaliente "cum laude". Awarded "Premio Extraordinario"

Fulvio Santacatterina. 2016. Metabolismo energético en patología y su traslación a la clínica". Universidad Autónoma de Madrid. Director: José M. Cuezva. Sobresaliente "cum laude".

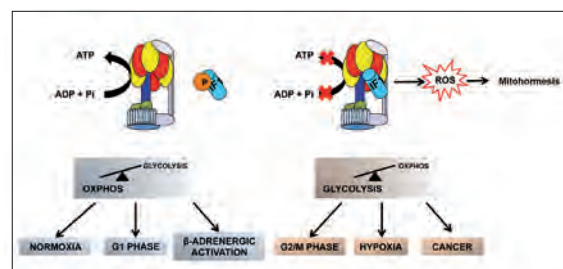


Figura 2. La fosforilación de IF1 inactiva su actividad inhibitoria porque previene su unión a la ATP sintasa y regula el metabolismo energético celular (Tomada de *Biochim. Biophys. Acta* (2016) 1857,1167-1182).

Figure 2. Phosphorylation of IF1 inactivates its inhibitory activity by preventing its binding to the ATP synthase to regulate cellular energy metabolism (Taken from *Biochim. Biophys. Acta* (2016) 1857,1167-1182).

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 Lázar 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:

Adrián Gabriel Zucco

Eva Martín del Pico

Daniel Meraviglia-Crivelli

Jocelyne López

Cristina Ojeda

Carolina Aguayo Herrera

Alfonso Gómez González

Rubén Martín-Blanco

Carolina Calero

Sonsoles Sánchez Fraile

Científicos visitantes /

Visiting Scientists:

Dr. Diego Miranda-Saavedra

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 dendríticas infectadas, que permiten la activación inicial de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, como en células infectadas por virus, que permiten su eliminación por dichos linfocitos. Analizamos nuevas rutas de procesamiento antigénico que son independientes de los transportadores TAP, tanto en infecciones por vaccinia como por citomegalovirus. 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. Los resultados tienen además implicaciones para la interferencia de herpes y poxvirus con la presentación antigénica y para la inmunoterapia del cáncer.

Trabajamos en modelos animales de infección por virus respiratorios, vaccinia y citomegalovirus, estudiando el papel de N-ras y eomesodermina en la respuesta inmune antiviral de linfocitos T CD8⁺ de memoria protectores, eficaces y duraderos, crítica para la vacunación.

Colaboramos con Manuel Ramos e Isidoro Martínez (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), Ezequiel Ruiz-Mateos (Hospital Universitario Virgen del Rocío e Instituto de Biomedicina de Sevilla), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas y Hospital del Mar, Barcelona), Pedro Aparicio (Facultad de Medicina, Universidad de Murcia) y Stipan Jonjic (University of Rijeka, Croacia).

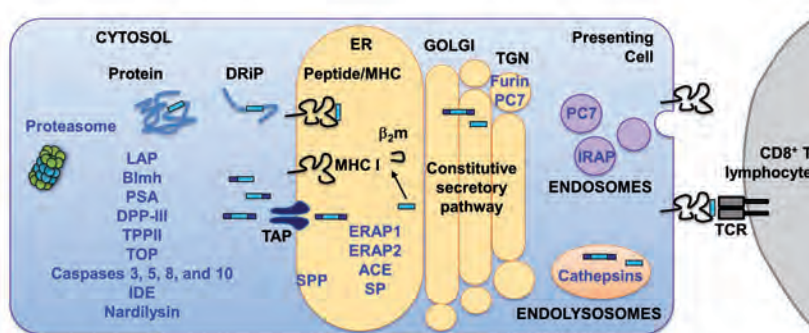


Figura 1. Vías de procesamiento y presentación antigénica para el reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ de las células infectadas por virus.

Figure 1. Antigen processing and presentation pathways for recognition of virus-infected cells by cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes.

Research summary

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

We study the mechanisms of antigen processing and presentation by MHC class I molecules in virus-infected dendritic cells, which de novo prime CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, and in virus-infected cells, which allow their elimination by these lymphocytes. We study novel routes of viral antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes, particularly those that are independent of TAP transporters after infection with vaccinia and cytomegalovirus. 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. The results impact herpes and poxvirus interference with antigen presentation and cancer immunotherapy.

We research on animal models of infection with respiratory viruses, vaccinia and cytomegalovirus, studying the role of N-ras and esomesodermin on the induction of efficient, protective and long-lasting antiviral CD8⁺ T lymphocyte memory responses, a basis for vaccines.

We have on-going collaborations with Manuel Ramos and Isidoro Martínez (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), Ezequiel Ruiz-Mateos (Hospital Universitario Virgen del Rocío e Instituto de Biomedicina de Sevilla), José Yélamos (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas and Hospital del Mar, Barcelona), Pedro Aparicio (Faculty of Medicine, Universidad de Murcia) and Stipan Jonjic (University of Rijeka, Croacia).

Publicaciones / Publications

Lázaro, S., Gamarra, D., Del Val, M. Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: a guerrilla army that partners with the proteasome. (2015). *Mol. Immunol.* **68**, 72-76.

Ramos, M., Lao, Y., Eguiluz, C., Del Val, M., and Martínez, I. Urokinase receptor-deficient mice mount an innate immune response to and clarify respiratory viruses as efficiently as wild-type mice. (2015) *Virulence*, **6**:7, 710-715.

Domínguez-Molina, B., Tarancón-Diez, L., Hua, S., Abad-Molina, C., Rodríguez-Gallego, E., Machmach, K., Vidal, F., Tural, C., Moreno, S., Goñi, J. M., Ramírez de Arellano, E., Del Val, M., González-Escribano, M. F., Del Romero, J., Rodríguez, C., Capa, L., Viciano, P., Alcamí, J., Yu, X. G., Walker, B. D., Leal, M., Lichtenfeld, M., Ruiz-Mateos E; (2016) on behalf of ECRIS integrated in the Spanish AIDS Research Network.. HLA-B*57 and IFNL4-related polymorphisms are associated with protection against HIV-1 disease progression in controllers. *Clin Infect Dis.* pii: ciw833.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Adrián Gabriel Zucco (2015). ChipSeq y el factor de transcripción eomes en linfocitos T CD8⁺. Trabajo de Fin de Grado de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Margarita del Val Latorre.

Cristina Ojeda González (2016). Caracterización de la respuesta inmunitaria celular frente al virus vaccinia. Tesis de Máster. Facultad de Ciencias. Universidades Autónoma de Madrid, Complutense de Madrid y de Alcalá de Henares (máster interuniversitario). Directores: Margarita del Val Latorre y Silvia Lázaro García.

Eva Martín del Pico (2016). Conservación evolutiva de la red de regulación génica operada por eomesodermina en gástrula de vertebrados. Trabajo de Fin de Grado de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Margarita del Val Latorre.

Begoña García Sastre (2016). Tratamiento periodístico de las vacunas. Trabajo de Fin de Grado de Periodismo. Facultad de Ciencias de la Comunicación. Universidad Rey Juan Carlos de Madrid. Director: Margarita del Val Latorre.

Otras actividades / Other activities

- Asesora adjunta de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva, Ministerio de Economía y Competitividad.
- Asesora de la Agencia Europea del Medicamento (EMA).
- Miembro del Advisory Council of la European Society for Virology.
- Evaluadora Internacional del Programa Horizonte 2020 de la Unión Europea.
- Divulgación Científica: series Ciencia con Chocolate, Jam Science y Pangea, charlas individuales, entrevistas en radio, prensa, vídeos y actividades online.

Genética y Biología Celular del cáncer: neoplasias linfoblásticas de células T precursoras

Genetics and Cell Biology of Cancer: T-cell lymphoblastic neoplasms



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José Fernández-Piqueras

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

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
María Carmen Arriba Pérez
María Ángeles Cobos-Fernández
Laura González-Sánchez
Pilar López Nieva
Concepción Vaquero Lorenzo

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*

Manuel Malavé Galiana
José Luis Marín Rubio
Ana María Roncero Sánchez
Irene Vázquez Domínguez

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*
Isabel Sastre Merlín

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Pablo Delgado Wicke
Ester Díaz Mora

Resumen de investigación

Las neoplasias linfoblásticas de células T, que son el centro de nuestra atención durante los últimos años, son neoplasias hematológicas agresivas derivadas de timocitos, precursores inmaduros de las células T. Como cualquier otro tipo de cáncer, constituyen un grupo altamente heterogéneo caracterizado por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que evolucionan desde el diagnóstico y se modifican significativamente en las recidivas. Desafortunadamente, las tasas de curación de pacientes con resistencia primaria o de los que desarrollan recaídas es inferior al 7%. Por tanto, el objetivo principal de nuestro trabajo ha sido la identificación de nuevos biomarcadores moleculares y la evaluación de vías de señalización, para contribuir a un mejor diagnóstico y pronóstico y proponer nuevas estrategias de tratamiento menos tóxicas y más efectivas. Nuestros resultados en el período 2015-2016 han sido publicados en revistas prominentes del área, como *Leukemia*, *Blood*, *Oncotarget*, y *J. Natl. Cancer Institute*. Entre nuestras contribuciones más destacables, hemos propuesto un modelo para explicar la agresividad de este tipo de linfomas basado en la desregulación de Fadd y sus patrones de distribución intracelular. En un esfuerzo colaborativo hemos participado en la demostración del papel del receptor CB2 cannabinoide en la señalización inducida por HER2 en cáncer de mama. Los análisis genómicos revelaron altos niveles de heterogeneidad intratumoral y editado de RNA, que afectan específicamente al gen *JAK2*. Los análisis transcriptómicos permitieron demostrar la existencia de diferencias específicas de sexo en la respuesta apoptótica radio-adaptativa inducida por el gen *TP53*. Finalmente, fuimos invitados por el editor de la prestigiosa revista *Blood* para elaborar un *Inside Commentary* sobre el descubrimiento de nuevas mutaciones en linfomas T. La dimensión traslacional de nuestro grupo se ha visto potenciada por nuestra incorporación al consorcio CIBERER (ISCIII) y al Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz.

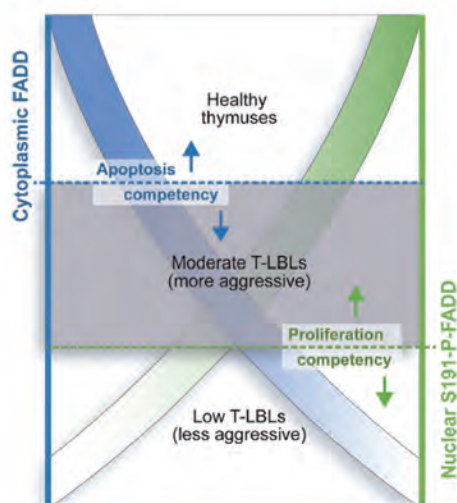


Figura 1. Modelo para explicar la agresividad de los linfomas linfoblásticos T basado en la desregulación de la expresión de Fadd y sus patrones de distribución intracelular.

Figure 1. Model to explain the differential aggressiveness of T-cell lymphoblastic lymphomas based on the deregulation of Fadd and its pattern of intracellular distribution.

Research summary

T-cell lymphoblastic neoplasms, which have been the centre of our attention during the last years, are aggressive haematological neoplasms derived from thymocytes, the immature precursors of T cells. As any type of cancer, T-cell lymphoblastic neoplasms consist of a very heterogeneous group characterized by the joint occurrence of genetic and epigenetic alterations, which evolve from the time of diagnosis and may be deeply modified in relapses. Unfortunately, cure rates of patients with primary resistance or those whose disease relapses are <7%. Therefore the major aim of our work has been to decipher new molecular biomarkers and evaluate cancer signalling pathways, to improve diagnosis and prognosis, and the proposal of more effective and less toxic treatments. In the period 2015-2016 our results have been published in prominent journals such as Leukemia, Blood, Oncotarget and J. Natl. Cancer Institute. Among our contributions, we have proposed a model to explain the differential aggressiveness of T-cell lymphoblastic lymphomas based on the deregulation of Fadd and its pattern of intracellular distribution. In a collaborative effort we have participated in demonstrating the role of cannabinoid receptor CB2 in HER2-signaling in breast cancer. Genomic approaches with T-LBL samples led us to demonstrate that there is a considerable genetic intratumoral heterogeneity helped by the existence of RNA editing events involving JAK2, a member of the Janus kinase family, during the development of T-cell lymphoblastic lymphomas. Transcriptome analysis allowed us to demonstrate sex-specific differences in the radio-adaptive response of thymocytes to TRP53-mediated apoptosis. More recently, we were invited by the Editor of the prestigious journal Blood to write an Inside Commentary related to the discovery of new mutations in T-cell lymphomas. Our translational dimension was strengthened by our incorporation to the CIBERER Consortium and to the Institute for Health Research Foundation Jiménez Díaz.

Publicaciones / Publications

Pérez-Gómez, E., Andradás, C., Caffarel, M.M., Blasco-Benito, S., García-Taboada, E., Villa-Morales, M., Moreno, E., Hamann, S., Flores, J.M., Martín, E., Wengers, A., Alkatout, I., Klapper, W., Bauer, M., Arnold, N., Soriano, J., Pérez, M., Megías, D., Moreno-Bueno, G., Ortega-Gutiérrez, S., Artola, M., Vázquez-Villa, H., Quintanilla, M., Fernández-Piqueras, J., Canela, E.I., McCormick, P.J., Guzmán, M., and Sánchez, C. (2015) Cannabinoid receptor CB2 is a pivotal regulator of HER2 oncogenic signaling in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**(6). pii: djv077.

Roncero, A.M., López-Nieva, P., Cobos-Fernández, M.A., Villa-Morales, M., González-Sánchez, L., López-Lorenzo, J.L., Llamas, P., Ayuso, C., Rodríguez-Pinilla, S.M., Arriba, M.C., Piris, M.A., Fernández-Navarro, P., Fernández, A.F., Fraga, M.F., Santos, J., and Fernández-Piqueras, J. (2016) Contribution of JAK2 to T-cell lymphoblastic lymphoma. *Leukemia* **30**, 94-103.

Marín-Rubio, J.L., de Arriba, M.C., Cobos-Fernández, M.A., González-Sánchez, L., Ors, I., Fernández-Piqueras, J., and Villa Morales, M. (2016) Deregulated FADD expression and phosphorylation in T-cell lymphoblastic lymphoma. *Oncotarget*. **7**, 61485-61499.

Fernández-Piqueras, J. (2016) New mutations for nodal lymphomas of TFH origin. *Blood*. **128**, 1446-7.

López-Nieva, P., Malavé, M., González-Sánchez, L., Fernández-Piqueras, J., Fernández-Navarro, P. and Javier Santos Hernandez, J. (2016) Transcriptomic analysis reveals sex-specific differences in the expression of Dcl1 and Fis1 genes in the radio-adaptive response of thymocytes to Trp53-mediated apoptosis. *BMC Genomics*. **17**:698.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Manuel Malavé Galiana (2015). Bases genéticas de la respuesta radioadaptativa en timocitos de ratón. UNIVERSIDAD (FACULTAD): Autónoma de Madrid (Facultad de Ciencias). DIRECTORES: José Fernández Piqueras, Javier Santos Hernández, y Pablo Fernández Navarro.

Ana María Roncero Sánchez (2015). Implicación de JAK2 en el desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T. UNIVERSIDAD (FACULTAD): Autónoma de Madrid (Facultad de Ciencias). DIRECTORES: José Fernández Piqueras y Pilar López Nieva.

Otras actividades / Other activities

-Co-organizador y ponente de la Sesión Científica Extraordinaria "La Epigenética en la salud y la enfermedad", Real Academia Nacional de Medicina/Fundación Ramón Areces, Madrid, 19 de Mayo de 2016.

-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 (Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid).

-Coordinador del Área de Biomedicina de la ANEP.

-Presidente del Comité Asesor de Expertos de FARPE y FUNDALUCE.

-Miembro de la Comisión de Bioética del CSIC.

-Miembro del Comité Ejecutivo de la Lección Conmemorativa Jiménez Díaz (Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz).

-Miembro del Comité Asesor 3 (Biología Celular y Molecular) de la Comisión Nacional Evaluadora de la Actividad Investigadora (CNEAI).

-Miembro del Comité Científico Externo del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) y de su Comisión Permanente.

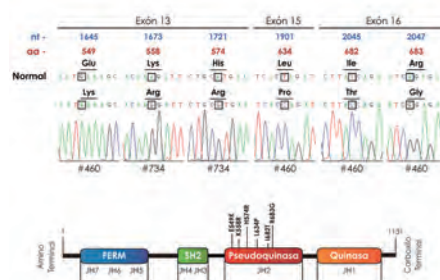


Figura 2. Nuevas mutaciones en el dominio pseudocinasas del gene JAK2 identificadas en linfomas linfoblásticos T

Figure 2. New mutations at the pseudokinase domain of JAK2 gene in T-cell lymphoblastic lymphomas.

Regulación y función de mediadores proinflamatorios y su implicación en enfermedades de etiología inflamatoria e inmune

Regulation and function of 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
Pablo Gómez del Arco

Postdoctorales/ *Postdoctoral Fellows*:
Ruth Álvarez Díaz
Alicia Arranz de Miguel
Konstantino Stamatakis Andriadi
Raquel Álvarez Velilla

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Cristina Poveda Cuevas
Marta Jiménez Martínez
Alba Jiménez Segovia
Javier Galán Martínez
Francisco Callejas Hernández
Inés Sánchez Gómez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

M^a Ángeles de Chorro de Villaceballos
M^a Carmen Maza Moreno
Ana Flores Robles

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Patricia Torres
Silvia Noemi Vázquez Cuesta
Raluca Alexandra Julia Neagoe
Alfonso Herreros
Inés Azagra Pontes

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Héctor O. Rodríguez
(Universidad de Venezuela)

Resumen de investigación

Hemos estudiado receptores de inmunidad innata (TLR) y prostaglandinas (PG) derivadas de ciclooxigenasa Cox2 en Inmunidad, Cáncer colorectal (CRC) y enfermedad de Chagas (CD). PGE2 a través de sus receptores EP2/4 promueve señales coestimuladoras necesarias para la activación/diferenciación Th1/Th17/Treg, controlando la duración de las interacciones T-DC sin afectar el “homing” ni la salida de las células Th de los ganglios linfáticos. La deficiencia de Cox-2 en los macrófagos conduce a una señalización p110gamma PI3K defectuosa y disminuye su adhesión celular y migración.

Los inhibidores de Cox2 reducen el CRC pero tienen efectos secundarios. Para evitar esos problema, buscamos efectores de Cox-2 que modulen sus efectos protumorales. Identificamos 72 genes potencialmente implicados en CRC. Entre ellos mPGES1, Dusp10 y PMEPA1 que se inducen por Cox-2-PGF2alfa-EGR1/NFAT y están sobreexpresados en CRC promoviendo la formación de tumores en modelos animales. Dusp10 evita la inhibición por contacto, controla la susceptibilidad a fármacos terapéuticos, uniéndose a Yap1. La expresión Dusp10 se correlaciona con Yap1 nuclear y con mal pronóstico en pacientes. PMEPA1 esta implicado en la transición mesénquima-epitelio, controlando E-cadherina y beta-catenina nuclear. mPGES1 se asocia a Cox-2 actuando en concierto para la liberación de PGE2 contribuyendo al CRC.

Mediante estrategias bioinformáticas y experimentales hemos identificado nuevos ligandos inmunomoduladores capaces de activar/inhibir TLRs y definido los de nuevas cascadas de transducción de señales en macrófagos y células endoteliales. Los ligandos TLR4 activan principalmente cascadas pro-inflamatorias, mientras que TLR2 también desencadena cascadas anti-inflamatorias. Además, hemos definidos ligandos duales de TLR2 y 4 simultáneamente que inducen diferentes señales que TLR2 o TLR4 solos. Este trabajo está bajo la protección de patentes y constituye la base de la spin off de CBM Diomune.

Además, con Nuria Girones estudiamos CD, identificando diferentes respuestas inmunológicas dependiendo de la cepa infectante, tanto en pacientes como en ratones.

Figura 1. PGE2 desempeña un doble papel en los macrófagos: dosis bajas en la periferia del foco inflamatorio promueven la formación y migración de los podosomas, mientras que altas dosis se acumulan en el foco inflamatorio induciendo la adhesión focal.

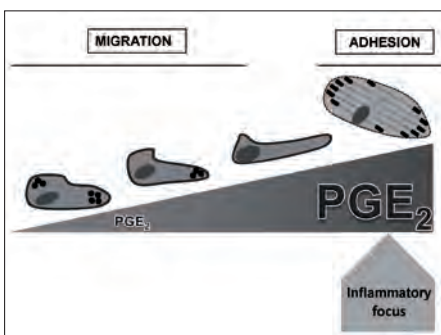


Figure 1. PGE₂ plays a dual role in macrophage physiology: Low doses in the periphery of the inflammatory focus promote podosome formation and migration, whereas high doses accumulated in the inflammatory focus inducing focal adhesion formation and adhesion.

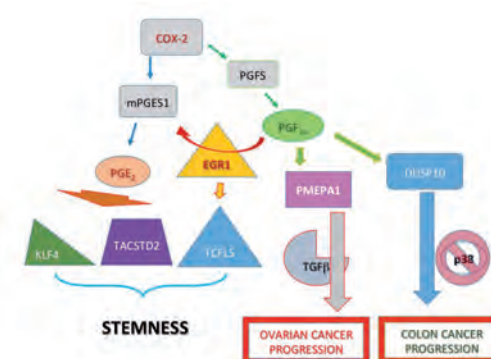


Figura 2. Señalización y genes inducidos por Cox-2 implicados en algunas de las propiedades tumorales adscritas Cox-2.

Figure 2. Downstream signaling and genes involved in some of the Cox-2 protumorigenic properties.

Research summary

We studied innate immunity receptors (TLR) and cyclooxygenases Cox2-derived prostaglandins (PG) in Immunity, colorectal cancer (CRC) and Chagas disease (CD). PGE2 through its EP2/4 receptors promoted co-stimulatory signals required for Th1/Th17 and Treg activation/differentiation, controlled the duration of T-DC interactions not affecting homing or egress of Th cells in draining lymph nodes during inflammation. Cox-2 deficiency in macrophages leads to defective p110gamma PI3K signalling and impairs cell adhesion and migration.

Cox2-inhibitors reduce CRC but had unwanted effects. To circumvent this, we searched for Cox-2 downstream effectors that modulate its protumoral effects. We identified 72 genes potentially involved in CRC. Among those, mPGES1, Dusp10 and PMEPA1 are Cox-2-PGF2alpha-EGR1/NFAT dependent genes overexpressed in human CRC promoting tumour formation in animal models. Dusp10 bypasses cell contact inhibition and controls susceptibility to therapeutic drugs, being a new partner of Yap1. Dusp10 expression correlates with both nuclear Yap1 and poor prognosis in human CRC. PMEPA1 is a gene involved in epithelial mesenchymal transition, controlling E-Cadherin and nuclear beta-catenin. mPGES1 is coexpressed with Cox-2 in CRC acting in concert releasing PGE2 contributing to CRC.

We analysed different ways to activate/inhibit TLRs through new specific structural and dynamic features of ligands, resulting in new immunomodulatory agents and characterized how the activate macrophages and endothelial cells defining novel signal transduction cascades. TLR4 ligands activate mostly pro-inflammatory cascades, whereas TLR2 also triggers anti-inflammatory cascades. More interestingly, we defined dual TLR2/4 ligands that induce different signals than TLR2 or TLR4 alone. This work is under patent protection and constitutes the basis of the CBM spin-off Diomune.

In addition, with Nuria Gironès we studied CD, identifying different immune responses depending of the infecting strain, both in patients and mice.

Publicaciones / Publications

Calvo-Álvarez, E; Stamatakis, K; Punzón, C; Álvarez-Velilla, R; Tejería, A; Escudero-Martínez, JM; Pérez-Pertejo, Y; Fresno, M; Balana-Fouce, R; Reguera, RM. (2015). *Plos Neglected Tropical Disease*; **9**: e0003666.

Gómez-García, PA; Arranz, A; Fresno, M; Desco, M; Mahmood, U; Vaquero, JJ; Ripoll, J. (2015). *Biophotonics South America*; **9531**: n° art. 953111.

González-Murillo, A; Fernández, L; Baena, S; Melen, GJ; Sánchez, R; Sánchez-Valdepeñas, C; Segovia, JC; Liou, HC; Schmid, R; Madero, L; Fresno, M. Ramirez, M. (2015). *Stem Cell* 2015; **33**: 2825-2837.

Guerrero, NA; Camacho, M; Vila, L; Iníguez, MA; Chillón-Marinas, C; Cuervo, H; Poveda, C; Fresno, M; Girones, N. (2015). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; **9**: e0004025.

Pineda, MA; Cuervo, H; Fresno, M, Soto, M, Bonay, P. (2015). *The Journal of Infectious Disease* 2015; **212**: 1160-1171.

Pineda, MA; Corvo, L; Soto, M; Fresno, M; Bonay, P. (2015). *Glycobiology* 2015; **25**: 197-210.

Stamatakis K, Jimenez-Martinez M, Jimenez-Segovia A, Chico-Calero I, Conde E, Galán-Martínez J, Ruiz J, Pascual A, Barrocal B, López-Pérez R, García-Bermejo ML, Fresno M. (2015). *Oncotarget*. 639941-59.

Calvo-Álvarez E, Stamatakis K, Punzón C, Álvarez-Velilla R, Tejería A, Escudero-Martínez JM, Pérez-Pertejo Y, Fresno M, Balaña-Fouce R, Reguera RM. (2015). *PLoS Negl Trop Dis*. **9** :e0003666.

C Cibrian, D., Saiz, M.L., De La Fuente, H., Sánchez-Díaz, R., Moreno-Gonzalo, O., Jorge, I., Ferrarini, A., Vázquez, J., Punzón, C., Fresno, M., Vicente-Manzanares, M., Daudén, E., Fernández-Salguero, P.M., Martín, P., Sánchez-Madrid, F. (2016). *Nature Immunology*, **17**, pp. 985-996.

Iriondo-DeHond, A., Martorell, P., Genovés, S., Ramón, D., Stamatakis, K., Fresno, M., Molina, A., Del Castillo, M.D. (2016). *Molecules*, **21**, art. no. 721.

Martínez-Pérez, A., Poveda, C., Ramírez, J.D., Norman, F., Gironés, N., Guhl, F., Monge-Maillo, B., Fresno, M., López-Vélez, R. (2016). *Acta Tropica*, **157**, pp. 145-150.

Sreeramkumar, V., Hons, M., Punzon, C., Stein, J. V., Sancho, D., Fresno, M., Cuesta, N. (2016). *Immunol Cell Biol* **94**: 39-51.

Osma-García, I.C., Punzón, C., Fresno, M., Díaz-Muñoz, M.D. (2016). *European Journal of Immunology*, **46**, pp. 677-688.

Ortiz, A., Husi, H., Gonzalez-Lafuente, L., Valino-Rivas, L., Fresno, M.,

Sanz, A. B., Mullen, W., Albalat, A., Mezzano, S., Vlahou, T., Mischak, H., Sanchez-Nino, M. D. (2016). *J Am Soc Nephrol*.

Salvador B, Arranz A, Francisco S, Córdoba L, Punzón C, Llamas MA, Fresno M. (2016). *Pharmacol Res*. **108**:46-56.

Liang X, Zang Y, Dong D, Zhang L, Fang M, Yang X, Arranz A, Ripoll J, Hui H, Tian J. (2016). *J Biomed Opt*. **21**:106005.

Fang M, Dong D, Zeng C, Liang X, Yang X, Arranz A, Ripoll J, Hui H, Tian J. (2016). *Sci Rep*. **6**:19241.

Arranz A, Rudin M, Zaragoza C, Ripoll J (2016). *Methods Mol Biol*. **1339**:367-76.

Arranz A, Ripoll J. (2015). *Front Pharmacol*. **6**:189.

Gómez-Del Arco P, Perdiguero E, Yunes-Leites PS, Acín-Pérez R, Zeini M, Garcia-Gomez A, Sreenivasan K, Jiménez-Alcázar M, Segalés J, López-Maderuelo D, Ormés B, Jiménez-Borreguero LJ, D'Amato G, Enshell-Seijffers D, Morgan B, Georgopoulos K, Islam AB, Braun T, de la Pompa JL, Kim J, Enriquez JA, Ballestar E, Muñoz-Cánoves P, Redondo JM. (2016). *Cell Metab*. **10**: 881-92.

MacGrogan D, D'Amato G, Travisano S, Martínez-Poveda B, Luxán G, Del Monte-Nieto G, Papoutsis T, Sbruggio M, Bou V, Gomez-Del Arco P, Gómez MJ, Zhou B, Redondo JM, Jiménez-Borreguero LJ, de la Pompa JL. (2016). *Circ Res.*, **13**:1480-97.

Nogués L, Reglero C, Rivas V, Salcedo A, Lafarga V, Neves M, Ramos P, Mendiola M, Berjón A, Stamatakis K, Zhou XZ, Lu KP, Hardisson D, Mayor F Jr, Penela P. (2016). *EBioMedicine*. 3964(16):30452-2.

Otras actividades / Other activities

Organización de reuniones, edición de libros, premios recibidos, etc

HOMIN Final Meeting - Madrid 29-30 September 2016. Organizadores: Manuel Fresno & Balbino Alarcón.

Patentes / Patents

M Fresno; N Gironés; M Ramirez-Orellana. Uso de TCFL5/Cha como nuevo marcador para el pronóstico y/o diagnóstico diferencial de Leucemias linfoblásticas agudas. P201630400. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 1 Abril 2015 . Propietario:UAM.

Acciones de los prostanoideos en procesos inflamatorios

Prostanoids actions in inflammatory processes



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

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Raquel Nieto Pintado (hasta diciembre 2015)
Ángel Bago Plaza (desde abril 2016)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Ana Renshaw Calderón

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Antonio Queiro Palou (2015/2016)
Laura Martínez Campesino (2015/2016)

Resumen de investigación

La modificación de ácidos grasos insaturados lleva a la producción de lípidos bioactivos como los ácidos grasos oxo o nitro, los cuales modulan la activación, diferenciación y función de diferentes tipos celulares, como los involucrados en el proceso inflamatorio y la respuesta inmune. Sus acciones tienen lugar principalmente mediante la modificación covalente de proteínas, como factores de transcripción o enzimas, o tras la activación de receptores nucleares y de membrana.

La oxigenación enzimática de los ácidos grasos genera lípidos bioactivos como los eicosanoides, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos. Diversos estudios han puesto de manifiesto su papel clave como moléculas de señalización en una serie de procesos fisiopatológicos, siendo considerados mediadores esenciales en una variedad de enfermedades inflamatorias como la artritis, la aterosclerosis y el cáncer. Nuestros estudios se centran en una clase particular de prostanoideos electrofílicos llamados ciclopentenonas (CyPGs), que juegan un papel importante en el proceso inflamatorio, actuando como agentes anti-inflamatorios.

Las especies de ácidos grasos electrofílicos también incluyen ácidos grasos nitrados, como los nitroalquenos del ácido linoleico o del oleico (LNO₂ y OA-NO₂). Estos compuestos son una nueva clase de mediadores electrofílicos endógenos que pueden ejercer acciones antiinflamatorias.

Nuestros estudios están dirigidos al análisis de los mecanismos moleculares involucrados en las acciones de estos compuestos como moduladores de la inflamación y la respuesta inmune. Para ello, analizamos su influencia en diversos parámetros de activación y función de macrófagos y linfocitos T, centrándonos en el estudio de sus efectos sobre la activación transcripcional y la expresión génica y sus consecuencias sobre la activación celular y la diferenciación.

La investigación sobre las bases moleculares y celulares de las acciones de los ácidos grasos electrofílicos en la inflamación y la respuesta inmune, es necesaria para comprender los posibles beneficios y riesgos de la intervención farmacéutica con estos lípidos en las enfermedades inflamatorias.

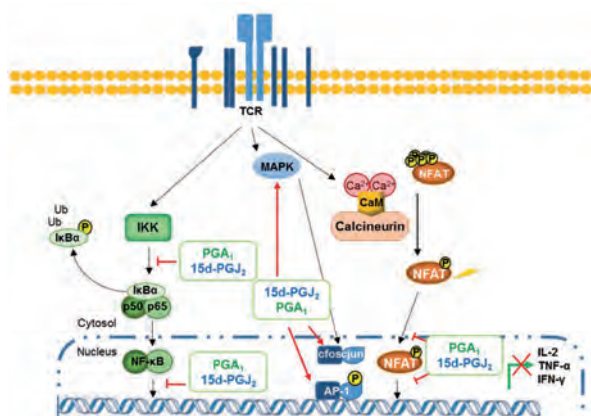


Figura 1. Modelo de las acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en células T activadas. Tras la señalización a través del receptor de la célula T (TCR), se desencadenan diferentes rutas de señalización que promueven finalmente la activación de diversos factores de transcripción, incluyendo NF-κB, AP-1 y NFAT. La activación de éstos es fundamental para la transcripción de genes esenciales en la respuesta inmune e inflamatoria, tales como IL-2, TNF-α e IFN-γ, entre otros. Las CyPGs 15d-PGJ2 y PGA1 interfieren sobre diferentes pasos en la activación de estos factores de transcripción, lo que tiene como resultado cambios en la expresión génica en linfocitos T activados, lo que da cuenta de sus propiedades anti-inflamatorias e inmunoregulatorias.

Figure 1. Model of CyPGs actions on gene expression in activated T cells. Upon signaling through the T cell receptor (TCR), different signaling pathways are activated, that ultimately promote the activation of various transcription factors, including NF-κB, AP-1 and NFAT. Activation of these factors is central for the transcription of essential genes in the immune and inflammatory response, such as IL-2, TNF-α and IFN-γ, among others. CyPGs 15d-PGJ2 and PGA1 interfere on different steps in the activation of these transcription factors, resulting in changes on gene expression in activated T lymphocytes, which accounts for their anti-inflammatory and immunoregulatory properties.

Research summary

Fatty acid modification results in the production of bioactive lipids as oxo or nitro fatty acids, agents that can modulate the activation, differentiation and function of different cell types, as those involved in the inflammatory process and the immune response. Their actions take place through their ability to covalently modify transcriptional regulatory proteins and enzymes and to activate various nuclear and membrane receptors, finally modifying protein function and altering patterns of gene expression.

Enzymatic oxygenation of fatty acids generates signalling mediators, as those of the eicosanoids lipid family, which includes prostaglandins and leukotrienes. Current knowledge show their key role as signalling molecules in an array of pathophysiological processes, being regarded as critical mediators in a variety of inflammatory diseases such as arthritis, atherosclerosis and cancer. Our current research is focused on a particular class of electrophilic compounds named cyclopentenones (CyPGs), which play an important role in the inflammatory process, acting as anti-inflammatory pro-resolving agents.

Electrophilic fatty acid species also include nitro-containing fatty acids as nitroalkene derivatives of linoleic and oleic acid (LNO₂ and OA-NO₂). These compounds are a novel class of endogenous, electrophilic mediators that can also exert adaptive anti-inflammatory signalling reactions.

Our research is aimed to the study of the molecular mechanisms involved in the actions displayed by these electrophilic fatty acids as modulators of inflammation and the immune response. To this end, we analyze their influence on diverse parameters of macrophage and T lymphocyte function, focusing on their effects on transcriptional activation and gene expression and their consequences on cell activation and differentiation.

Research on the molecular and cellular basis of the actions of electrophilic fatty acids in inflammation and the immune response is required to clearly understand the potential benefits and risks of pharmaceutical intervention with these lipids in the onset and progress of inflammatory diseases.

Publicaciones / Publications

Guillem-Llobat P. and Iñiguez M.A. (2015). Inhibition of lipopolysaccharide-induced gene expression by liver X receptor ligands in macrophages involves interference with Early Growth Response Factor 1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; **96**:37-49.

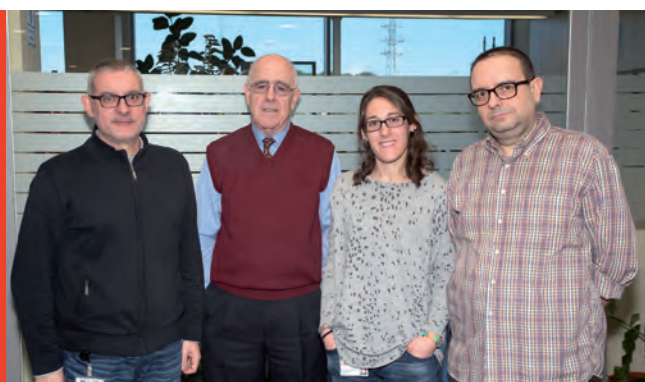
Guerrero NA, Camacho M, Vila L, Iñiguez MA, Chillón-Marinas C, Cuervo H, Poveda C, Fresno M, Gironès N. (2015). Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute Trypanosoma cruzi Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. **25**:9.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Raquel Nieto Pintado (2015). Estudio de las acciones de prostaglandinas ciclopentenonas sobre la activación de linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Miguel A. Iñiguez.

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:
Isabel Martínez Carrascoso

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
José Alcalde García

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Elena Silion

Resumen de investigación

TIA1, TIAR and HuR regulan la expresión genética controlando aspectos del metabolismo del RNA celular, como son: i) la transcripción, por su interacción con el DNA y la RNA polimerasa II; ii) el procesamiento del pre-mRNA, por la selección de sitios 5'/3' atípicos de splicing; iii) la localización, estabilidad y/o traducción de mRNAs eucarióticos, por la interacción con secuencias 5' y/o 3' no traducibles y/o microRNAs, y iv) su incidencia sobre programas biológicos fundamentales (inflamación, proliferación, autofagia, apoptosis, embriogénesis, estrés o infecciones por virus).

Nuestra Hipótesis es que estas proteínas son esenciales en el control de la expresión genética adaptando la dinámica del transcriptoma y proteoma, su expresión y función, con el fin de sobrevivir a situaciones aberrantes que comprometan la homeostasis celular en condiciones fisiopatológicas. Así, hoy y en el futuro, nuestro Objetivo principal es comprender los procesos celulares y los mecanismos moleculares tempranos y tardíos en los que participan y cómo contribuyen a evitar el desarrollo y/o progresión de fenotipos deletéreos.

A través del desarrollo de modelos celulares de ganancia de función mediante un sistema inducible con tetraciclina, hemos demostrado que la expresión ectópica de los antígenos TIA frente a HuR promueve la autorregulación de su splicing, la inhibición parcial de la traducción general, el arresto del ciclo celular en G1/S y la muerte celular por autofagia y apoptosis dependiente de caspasas. Estos fenotipos se asociaron con una regulación selectiva de genes de la vía de p53. Ratones inmunodeprimidos inoculados con células que expresan TIA1/TIAR retrasan, e incluso inhiben, el crecimiento de tumores. El análisis de una cohorte de tumores de pulmón humano demostró expresión reducida de estas proteínas en carcinomas de células escamosas de pulmón. Nuestros resultados apoyan que las proteína TIA (isoformas b) funcionan como genes supresores de crecimiento celular y tumoral, sugiriendo que podrían ser guardianes celulares.

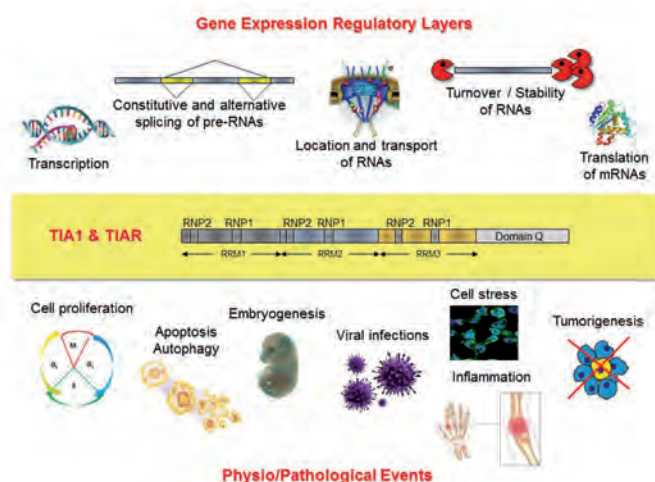


Figura 1. Las proteínas multifuncionales TIA regulan la expresión genética y muchos eventos fisiopatológicos importantes.

Figure 1. The multifunctional TIA proteins regulate gene expression and many relevant physiopathological events.

Research summary

The antigens TIA1, TIAR and HuR are involved in the regulation of gene expression on different aspects of the metabolism of cell RNA, 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'/3' splicing sites; iii) localization, stability and/or translation of eukaryotic mRNAs through the interaction with 5' and/or 3' untranslated regions and/or microRNAs; and iv) modulation of pivotal biological programs (inflammation, proliferation, autophagy, apoptosis, embryogenesis, cell stress or infections by viruses).

Our Hypothesis is that these regulators play a central role in controlling gene expression by regulating the dynamics of human transcriptome and proteome, their expression and function, to prevent situations which put aberrant cell viability at risk in patho-physiological situations. Thus, today and the next future, our main Goal is to characterize the cellular processes and molecular mechanisms at early and long-term in which they are involved and how contribute to cell survival via preventing the development and/or progression of deleterious cell phenotypes.

Through the development of gain-of-function cell models by using a tetracycline-inducible system, we have shown that ectopic expression of TIA antigens versus HuR promotes their splicing autoregulation, partial inhibition of global translation, G1/S arrested cell-cycle and cell death by autophagy and caspase-dependent apoptosis. These cell phenotypes were associated with a selective upregulation of p53 signaling pathway-related genes. Nude mice injected with doxycycline-inducible cells expressing TIA1/TIAR retard, or even inhibit, growth of xenotumors. Finally, the analysis of a cohort of lung tumors showed the decreased expression of TIA proteins in lung squamous cell carcinomas. Our results support that TIA proteins (isoforms b) have the ability to function as suppressor genes of cell and tumor growth, suggesting that these antigens could play an important role as cellular gatekeepers.

Publicaciones / Publications

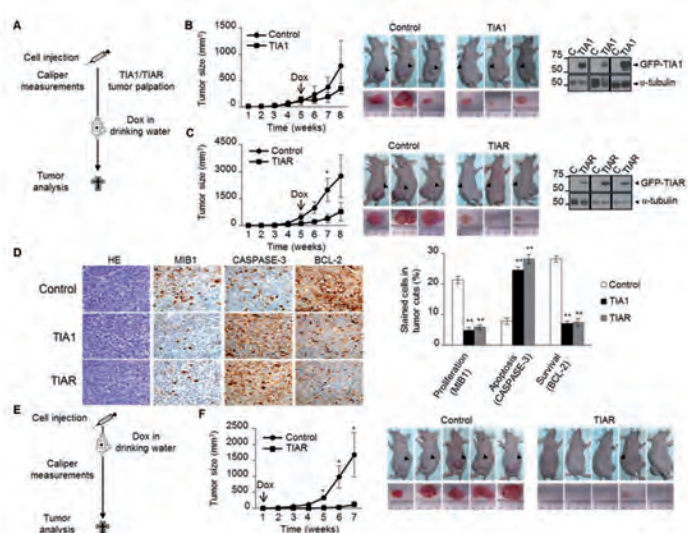
Sánchez-Jiménez, C., Ludeña, M. D. and Izquierdo, J. M. (2015) T-cell intracellular antigens function as tumor suppressor genes. *Cell Death Dis.* **5**, 6:e1669.

Sánchez-Jiménez, C. and Izquierdo, J. M. (2015) T-cell intracellular antigens in health and disease. *Cell Cycle.* **14**, 2033-2043.

Klionsky, D. J. et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* **12**, 1-222.

Figura 2. La expresión de las proteínas TIA (isoformas b) suprime el crecimiento tumoral *in vivo*. (A-C) Esquema de trabajo y representación gráfica de la progresión tumoral después de la inoculación de células que expresan las proteínas TIA1/TIAR y tratamiento con doxiciclina (DOX). (D) Secciones histológicas y caracterización inmunohistoquímica de los xenotumores. (E y F) Esquema de trabajo y representación gráfica de la progresión tumoral después de la inoculación de células que expresan TIAR y tratamiento con doxiciclina (DOX).

Figure 2. Expression of TIA proteins (isoforms b) suppresses *in vivo* tumor growth. (A-C) Workflow and plots of progression of tumor size after inoculation of TIA1/TIAR-expressing cells and doxycycline (DOX) treatment. (D) Histological sections and immunohistochemical characterization of xenograft tumors. (E and F) Workflow and plot of progression of tumor size after inoculation of TIAR-expressing cells and doxycycline (DOX) treatment.



Fisiopatología Molecular de la Fibrosis

Molecular Pathophysiology of Fibrosis



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

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*

Marta Fierro Fernández
M^a Ángeles Higuera López
(Hasta junio 2015)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

M^a. Estrella Soria López
M^a. Cristina Espinosa Díez
(Hasta febrero 2015)
Verónica Miguel Herranz
Carlos Rey Serra

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Eva M^a Blanco Ruiz

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Juan Carlos Lara Sevilla
Alba Santos Hipólito
Patricia Ramos Panadero
Sonia Mota Zamorano
Laura Expósito Marqués

Resumen de investigación

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. Su establecimiento implica la sustitución de tejido celular vivo por matriz extracelular con la subsiguiente pérdida funcional. Por ello resulta crítico conocer los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de fibrogénesis en patología humana. Los microRNAs son reguladores post-transcripcionales esenciales de múltiples rutas fisiológicas y fisiopatológicas, entre ellas la de la fibrosis orgánica. En el laboratorio queremos comprender la contribución de los cambios metabólicos celulares asociados a la fibrosis, promotores a su vez de respuestas redox específicas que activan la expresión de microRNAs relevantes en fibrogénesis. Para ello utilizamos modelos celulares y animales de fibrosis, con especial énfasis en la patología renal, incluyendo modelos de ratones transgénicos o deficientes en genes implicados en fibrogénesis. Uno de los problemas clave en este contexto es el de la identificación del origen de los miofibroblastos, las células clave en la generación de matriz extracelular. Mediante el conocimiento de las bases celulares, moleculares y metabólicas de la fibrogénesis renal pretendemos identificar miRNAs que puedan utilizarse como dianas terapéuticas o marcadores que permitan detener o revertir la progresión de la enfermedad renal.

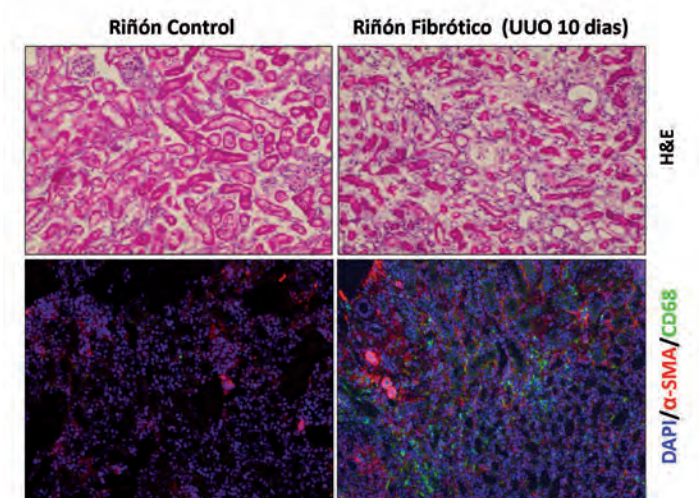


Figura 1. Incremento de la matriz extracelular en el espacio intersticial y en las paredes de los capilares glomerulares tras ligadura ureteral (UUO). Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) e inmunofluorescencia.

Figure 1. Increased deposit of extracellular matrix in the interstitial space and within the walls of glomerular capillaries after ureteral ligation (UUO). Staining with hematoxylin and eosin (H&E) and immunofluorescence.

Research summary

Fibrosis is the final common outcome in many diseases such as diabetic nephropathy, liver cirrhosis, scleroderma, myocardial sclerosis, and idiopathic or inflammation-mediated pulmonary fibrosis. Its establishment involves the replacement of cellular living tissue by extracellular matrix, with the subsequent functional derangement. Thus, it is critical to understand the underlying molecular pathways leading to fibrogenesis in human pathology. MicroRNAs are essential post-transcriptional regulators of gene expression for multiple physiological and pathophysiological pathways, including organ fibrosis. Our laboratory aims to unravel the contribution of the cellular metabolic changes associated to fibrogenesis responsible for triggering specific redox responses and the subsequent activation of defined subsets of miRNAs. To this end we use cellular and animal models of fibrosis, with an especial emphasis on renal pathology. These include transgenic and null mice models for specific genes involved in fibrogenesis. A key problem in the field of renal fibrogenesis is the identification of the source of myofibroblasts, the key cellular players in the generation of extracellular matrix. By deciphering the cellular, molecular and metabolic bases of renal fibrogenesis we plan to identify those miRNAs that may be useful either as therapeutic targets or biomarkers, thus allowing to halt or revert the progression of kidney disease.

Publicaciones / Publications

Miguel, V., Busnadiego, O., Fierro-Fernández, M. and Lamas S. (2016) Protective role for miR-9-5p in the fibrogenic transformation of human dermal fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair*. **9**:7

Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V.V., Muzykantov, V.R., Laher, I., Li, H., Lamas, S. and Münzel, T (2016) Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*.

Lu SC, Mato JM, Espinosa-Diez C, Lamas S. (2016) MicroRNA-mediated regulation of glutathione and methionine metabolism and its relevance for liver disease. *Free Radic Biol Med*. **100**:66-72.

Daiber, A., Di Lisa, F. and Lamas S. (2016) Virtual issue by COST Action BM1203 (EU-ROS) "Emerging concepts in redox biology and oxidative stress". *Redox Biol*. **8**:439-41.

Fierro-Fernández, M., Miguel, V., and Lamas, S (2016). Role of redoximirs in fibrogenesis. *Redox. Biol*. **7**, 58- 67.

Sánchez-Gómez, F.J., Calvo, E., Bretón-Romero, R., Fierro-Fernández, M., Anilkumar, N., Shah, A.M., Schröder, K., Brandes, R.P., Vázquez, J., and Lamas, S. (2015) NOX4-dependent Hydrogen peroxide promotes shear stress-induced SHP2 sulenylation and eNOS activation. *Free Radic Biol Med*. **89**, 419-30.

Fierro-Fernández, M., Busnadiego, Ó., Sandoval, P., Espinosa-Diez, C., Blanco-Ruiz, E., Rodríguez, M., Pian, H., Ramos, R., López-Cabrera, M., García-Bermejo, M.L., and Lamas S. (2015) miR-9-5p suppresses profibrogenic transformation of fibroblasts and prevents organ fibrosis by targeting NOX4 and TGFB2. *EMBO Rep*. **16**, 1358-77.

Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S. and Lamas, S. (2015) Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. **6**:183-97.

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. and Lamas S. (2015) Targeting of GammaGlutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF-β- Dependent Fibrogenesis. *Antioxid Redox Signal*. **23**:1092-105.

Busnadiego, O., Loureiro-Álvarez, J., Sandoval, P., Lagares, D., Dotor, J., Pérez-Lozano, M.L., López Armada M.J., Lamas, S., López-Cabrera, M. and Rodríguez-Pascual, F. (2015) A pathogenetic role for endothelin-1 in peritoneal dialysis-associated fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. **26**:173-82.

Otras actividades / Other activities

-Coordinación de la red "FIBROTEAM", Programa de Biomedicina, Comunidad de Madrid.

-Coordinación de la red de excelencia "CONSOLREDOX", Ministerio de Economía y Competitividad.

-Editor Jefe Asociado de la Revista "Redox Biology" (S.Lamas).

-Premio Health Science, Oxygen Club of California (S.Lamas).

-Científico visitante en Yale University (abril-agosto 2016, S.Lamas).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Cristina Espinosa Díez (2015). Papel de la gamma-glutamylcisteinilgasa en modelos de daño vascular y fibrótico e implicación de miR-433 en la síntesis de glutatión. Calificación: Sobresaliente cum Laude. 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
Guadalupe González Mateo
Abelardo Aguilera Peralta

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Ángela Rynne Vidal
Georgios Liappas
Vicente Ruiz Carpio

Técnico de Investigación / Technical Assistance:
Patricia Albar Vicáino

Estudiantes / Undergraduate Students:
Diego González Romero
Lucía Cremades Jimeno

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

Anne-Catherine Raby
Institute of Infection & Immunity, Cardiff University,
School of Medicine, Cardiff, UK
(Octubre-Diciembre 2016)

Christine-Maria Horejs Infection & Immunity,
Department of Medical Biochemistry and Biophysics,
Karolinska Institutet, Sweden
(Enero 2016)

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 sí 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.

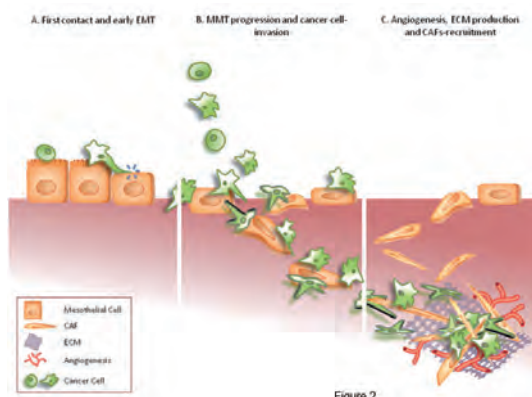


Figura 1. La diseminación peritoneal es una ruta frecuente de metástasis para los cánceres de ovario y del tracto gastrointestinal. Nosotros hemos demostrado que en los implantes metastásicos peritoneales una subpoblación de fibroblastos asociados a carcinoma (CAFs) derivan de las células mesoteliales vía transición mesotelio mesénquima (MMT). Además, la MMT promueve la adhesión e invasión de las células tumorales.

Figure 1. Peritoneal dissemination is a frequent metastatic route for cancers of the ovary and gastrointestinal tract. We have shown that in peritoneal metastatic implants a sub-population of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) derives from mesothelial cells through mesothelial to mesenchymal transition (MMT). Moreover, MMT promotes the adhesion and invasion of tumor cells.

Research summary

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 (also termed Mesothelial to Mesenchymal Transition, MMT) 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

Liappas G, González-Mateo GT, Sánchez-Díaz R, Lazcano JJ, Lasarte S, Matesanz-Marín A, Zur R, Ferrantelli E, Ramírez LG, Aguilera A, Fernández-Ruiz E, Beelen RH, Selgas R, Sánchez-Madrid F, Martín P, López-Cabrera M. (2016). *J Am Soc Nephrol*. 27:3561-3576.

Liappas G, González-Mateo G, Aguirre AR, Abensur H, Albar-Vizcaino P, Parra EG, Sandoval P, Ramírez LG, Del Peso G, Acedo JM, Bajo MA, Selgas R, Sánchez Tomero JA, López-Cabrera M, Aguilera A. (2016). *Oncotarget*. 7:30133-30146.

Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Guerra-Azcona G, Pérez-Lozano ML, Rynne-Vidal A, Albar-Vizcaino P, Gil-Vera F, Martín P, Coronado MJ, Barcena C, Dotor J, Majano PL, Peralta AA, López-Cabrera M. (2016); *J Pathol*. 239:48-59.

Ferrantelli E, Liappas G, Vila Cuenca M, Keuning ED, Foster TL, Vervloet MG, López-Cabrera M, Beelen RH. (2016). The dipeptide alanyl-glutamine ameliorates peritoneal fibrosis and attenuates IL-17 dependent pathways during peritoneal dialysis. *Kidney Int*. 89: 625-635.

González-Mateo GT, Aguirre AR, Loureiro J, Abensur H, Sandoval P, Sánchez-Tomero JA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Ruiz-Carpio V, Selgas R, López-Cabrera M, Aguilera A, Liappas. (2015). *G. Biomed Res Int*. 2015:989560.

Ferrantelli E, Liappas G, Keuning ED, Vila Cuenca M, González-Mateo G, Verkaik M, López-Cabrera M, Beelen RH. (2015). *Biomed Res Int*. 2015:106902.

del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, Remón C, Ossorio M, Fernández-Perpén A, Sánchez-Tomero JA, Cirugeda A, de Sousa E, Sandoval P, Díaz R, López-Cabrera M, Bajo MA. (2016). *Perit Dial Int*. 36:129-134.

González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snel J, López-Cabrera M, Erler JT, Hanemaaijer R, Lara-Pezzi E, Rodríguez-Pascual F. (2016). *Cardiovasc Res*. 109:67-78.

Rynne-Vidal A, Jiménez-Heffernan JA, Fernández-Chacón C, López-Cabrera M, Sandoval P. (2015). *Cancers (Basel)*. 7:1994-2011. Review.

Fierro-Fernández M, Busnadiego Ó, Sandoval P, Espinosa-Díez C, Blanco-Ruiz E, Rodríguez M, Pian H, Ramos R, López-Cabrera M, García-Bermejo ML, Lamas S. (2015). *EMBO Rep*. 16:1358-1377.

Liappas G, González-Mateo GT, Majano P, Sánchez-Tomero JA, Ruiz-Ortega M, Rodríguez Díez R, Martín P, Sánchez-Díaz R, Selgas R, López-Cabrera M, Aguilera Peralta A. (2015). *Biomed Res Int*. 2015:416480.

Busnadiego O, Gorbenko Del Blanco D, González-Santamaría J, Habashi JP, Calderon JF, Sandoval P, Bedja D, Guinea-Viniegra J, López-Cabrera M, Rosell-García T, Snel JM, Hanemaaijer R, Forteza A, Dietz HC, Egea G, Rodríguez-Pascual F. (2015). *J Mol Cell Cardiol*. 85:48-57.

Benedicto I, Gondar V, Molina-Jiménez F, García-Buey L, López-Cabrera M, Gastaminza P, Majano PL. (2015) *J Virol*. 89:4180-4190.

Busnadiego O, Loureiro-Álvarez J, Sandoval P, Lagares D, Dotor J, Pérez-Lozano ML, López-Armada MJ, Lamas S, López-Cabrera M, Rodríguez-Pascual F. (2015). *J Am Soc Nephrol*. 26:173-182.

Guadalupe González-Mateo, Juan Manuel Gallardo, José Antonio Sánchez-Tomero, Pedro Majano, Elizabeth Flores-Maldonado, Ramón Paniagua, Rafael Selgas, Manuel López-Cabrera and Abelardo Aguilera. Pharmacological Preservation of Peritoneal Membrane in Peritoneal Dialysis LIBRO: Some Special Problems in Peritoneal Dialysis, Páginas, inicial: 25 final: 49. Fecha: 2016. Editorial: InTech, Dr. Robert Ekart (Ed.)

José A. Jiménez Heffernan, Gloria del Peso Gilsanz, Manuel López Cabrera, Rafael Selgas Gutiérrez y Alvaro Gotloib (in memoriam). De la histología a la función: El peritoneo como membrana dializante y biológicamente activa. LIBRO: Tratado de Dialisis peritoneal (2ª Edición) Páginas, inicial: 23 final: 36. Fecha: 2015. Editorial: ELSEVIER. Eds: Jesús Momtenegro; Ricardo Correa; Miguel Carlos Riella.

Otras actividades / Other activities

-Comités Científicos

2009-present: Member of the External Scientific Advisory Board of "Instituto de Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Madrid)".

Tesis doctorales / Doctoral theses

Angela Rynne-Vidal (2016). El origen mesotelial de los fibroblastos asociados a cáncer en la metástasis peritoneal. La transición mesotelio-mesénquima como posible diana terapéutica. Autónoma de Madrid (Mención Europea). C. Biológicas Directores: Manuel López Cabrera y Pilar Sandoval Correa.

Vicente Ruiz Carpio (2015). Análisis de la huella genética de la transición mesotelio mesenquimal: Caracterización de nuevos marcadores en dialysis peritoneal. Complutense de Madrid. C. Biológicas. Directores: Manuel López Cabrera y Abelardo Aguilera.

Georgios Liappas (2015). Early leukocyte activation receptor CD69: a novel player in the maintenance of the TH17/Treg balance peritoneal fibrosis. Autónoma de Madrid (Mención Europea). C. Biológicas. Director: Manuel López Cabrera.

Patentes / Patents

A. Aguilera, M. López-Cabrera, R. Selgas, J. Passlick-Deetjen, J. Büchel, S. Stephan. Development of a more biocompatible peritoneal dialysis solution based on stevioside as osmotic agent. Application Number: EP 14 191 301. Date Priority: October 31st, 2014. PCT application: PCT/EP2015/074955. Date of PCT: October 28th, 2015. Patented in: EC, USA and Japan AP14191301. Ownership: Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA.

M. López-Cabrera, A. Aguilera, R. Selgas, J. Passlick-Deetjen, J. Büchel, S. Steppan. Título: Method and kit for diagnosing epithelial to mesenchymal transition of the peritoneum (EMT-Chip). Application Number: DE 102015115158.8. Country of Priority: Germany. Date of Priority: 2015. Ownership: Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA.

Inmunología de los antígenos de histocompatibilidad

Immunology of human histocompatibility antigensJefe de Línea / *Group Leader:*

José A. López de Castro Álvarez

Postdoctorales/ *Postdoctoral Fellows:*

Carlos Álvarez-Navarro

(Hasta mayo 2015)

Alejandro Sanz Bravo

Adrián Martín Esteban

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*

Pablo Guasp Baratech

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Ariadna Britto

Resumen de investigación

INTERACCION FUNCIONAL ENTRE LAS AMINOPETIDASAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO ERAP1 Y ERAP2 Y LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I (MHC-I) IMPLICADOS EN ENFERMADES INFLAMATORIAS. Las enfermedades inflamatorias más fuertemente asociadas con los antígenos del MHC-I también lo están con las aminopeptidasas del retículo endoplásmico ERAP1 y/o ERAP2, frecuentemente en epistasis, en el caso de ERAP1, con el alelo MHC-I de susceptibilidad. Nuestro trabajo en los dos últimos años se ha centrado en el efecto del polimorfismo de ERAP1 y de la expresión de ERAP2 en la configuración de los peptidomas constitutivos de tres moléculas de MHC-I fuertemente asociadas a otras tantas enfermedades: HLA-B*27 y espondilitis anquilosante, A*29:02 y retinopatía en perdigonada y HLA-B*51 y enfermedad de Behçet. Nuestros estudios revelan que: 1) el polimorfismo de ERAP1 influye significativamente en los peptidomas de las tres moléculas de MHC-I, induciendo alteraciones cuantitativas en la expresión de muchos ligandos. Los efectos son dependientes de péptido y de la variante enzimática y son diferentes en función de la especificidad peptídica de cada molécula de MHC-I. Con todo, la existencia de un patrón análogo de influencia sobre la longitud, secuencia y afinidad de los distintos peptidomas sugiere que mecanismos dependientes de péptido subyacen a la contribución conjunta de ERAP1 y MHC-I a distintas enfermedades inflamatorias; 2) el efecto de ERAP2 sobre el peptidoma de HLA-B*27 en células vivas se ha determinado por vez primera en una molécula de MHC-I. Esta enzima influye en el peptidoma de HLA-B*27 destruyendo de manera específica, pero muy significativa, ligandos con residuos N-terminales básicos. Nuestros resultados indican un papel central de los péptidos, no limitado necesariamente a la presentación de antígenos específicos, en las enfermedades asociadas a MHC-I y sugieren que alteraciones profundas en el peptidoma subyacen a la asociación conjunta de ERAP1/2 y MHC-I a enfermedad.

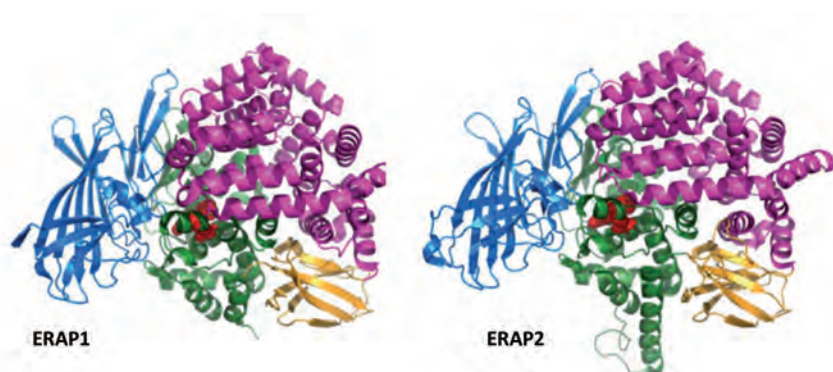


Figura 1. Estructuras tridimensionales de ERAP1 y ERAP2 mostrando, en diferentes colores, los cuatro dominios de cada enzima y, en rojo, la localización del centro activo.

Figure 1. Three-dimensional structures of ERAP1 and ERAP2 showing, in different colors, the four domains of each enzyme and, in red, the location of the catalytic site.

Research summary

FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASES ERAP1 AND ERAP2 AND INFLAMMATORY DISEASE ASSOCIATED MHC-I MOLECULES. The inflammatory diseases that are most strongly associated with major histocompatibility Complex class I (MHC-I) alleles are also influenced by endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP) 1 and/or 2, often in epistasis with the susceptibility MHC-I allele. Our work in the last two years focused on the effect of ERAP1 polymorphism and ERAP2 expression in shaping the constitutive peptidomes of three MHC-I molecules that are strong susceptibility factors for three different diseases: HLA-B*27 and ankylosing spondylitis, A*29:02 and birdshot chorioretinopathy and HLA-B*51 and Behçet's disease. Our studies revealed that: 1) ERAP1 polymorphism has a profound influence on the peptidome of the three MHC-I molecules, inducing quantitative alterations that affect many peptides. The effects are peptide- and ERAP1 variant-dependent and are different depending on the binding specificity of each MHC-I molecule. Yet, a pattern emerges of an influence on peptide length, sequence and affinity of disparate peptidomes, suggesting that peptide-mediated mechanisms may underlie the joint contribution of ERAP1 and MHC-I to distinct inflammatory diseases; 2) the effect of ERAP2 on the peptidome of HLA-B*27 in live cells was determined for the first time in an MHC-I molecule. This enzyme has a specific, but very significant, effect on the HLA-B*27 peptidome consisting mainly in the destruction of peptides with basic N-terminal residues. Our results indicate a central role of peptides, not necessarily limited to specific antigen presentation, in MHC-I associated diseases and suggest that profound peptidome alterations underlie the joint association of ERAP1/2 and MHC-I to inflammatory disease.

Publicaciones / Publications

Sanz-Bravo, A., Campos, J., Mazariegos, M.S., and López de Castro, J.A. (2015). Dominant role of the ERAP1 polymorphism R528K in shaping the HLA-B27 peptidome through differential processing determined by multiple peptide residues. *Arthritis & Rheum.* **67**: 692-701.

Alvarez-Navarro, C., Martín-Esteban, A., Barnea, E., Admon, A. and López de Castro, J.A. (2015). ERAP1 polymorphism relevant to inflammatory disease shapes the peptidome of the birdshot chorioretinopathy-associated HLA-A*29:02 antigen. *Mol. Cell Proteomics* **14**:1770-1780.

Guasp, P., Alvarez-Navarro, C., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., Marcilla, M., Barnea, E., Admon, A. and López de Castro, J.A. (2016). The peptidome of Behçet's disease-associated HLA-B*51:01 includes two subpeptidomes differentially shaped by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *Arthritis & Rheum.* **68**: 505-515.

Martín-Esteban, A., Guasp, P., Barnea, E., Admon, A., and López de Castro, J.A. (2016). Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis Associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 with the HLA-B*27 Peptidome in Human Cells. *Arthritis & Rheum.* **68**: 2466-2475.

López de Castro, J.A. Alvarez-Navarro, C., Brito, A., Guasp, P., Martín-Esteban, A. and Sanz-Bravo, A. (2016). Molecular and pathogenic effects of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in MHC-I-associated inflammatory disorders: towards a unifying view. *Mol. Immunol.* **77**: 193-204.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Carlos Álvarez Navarro (2015). El peptidoma en enfermedades asociadas a antígenos de MHC-I. Mimetismo molecular entre ligandos de HLA-B*27 en artritis reactiva e interacción funcional de ERAP1 y HLA-A*29 en la retinopatía en perdigonada. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José A. López de Castro

Alejandro Sanz Bravo (2015). Mecanismo molecular implicado en la configuración del peptidoma de HLA-B*27 por variantes naturales de ERAP1 asociadas a la espondilitis anquilosante. Universidad Autónoma de Madrid. Director: José A. López de Castro.

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

Patho-physiological implications of G protein-coupled receptors signaling networks



Jefe de Línea / Group Leader:
Federico Mayor Jr

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Laura Nogués Vera
(Hasta abril 2015)
Rocío Vila Bedmar

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alba Concepción Arcones
Álvaro Caballero Lombraña
Sofía Cabezudo
Marta Cruces-Sande

Elisa Lucas Fernández
(Hasta junio 2015)
María Margarida Martins
Neves
Adolfo Javier Molejón
Julia Palacios-García
Clara Reglero

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

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Alejandro Asensio
Irene Herranz
Marta Iborra
Marcus de Britto Wilson

Resumen de investigación

Receptores acoplados a proteínas G: redes de señalización e implicaciones fisiopatológicas/ Patho-physiological implications of G protein-coupled receptors signaling networks.

Nuestro grupo está interesado en investigar las redes de señalización mediadas por receptores acoplados a proteínas G: (GPCR) y sus implicaciones fisiopatológicas, con énfasis en el papel de la quinasa GRK2 (G-protein-coupled receptor kinase 2) y en los GPCR acoplados a Gq.

Además de modular GPCR, GRK2 actúa como un importante nodo de señalización, mediante la interacción y/o fosforilación con múltiples proteínas celulares. Las interacciones integradas de GRK2 explican su papel en el control de procesos como migración y proliferación celular, angiogénesis o resistencia a insulina (RI). Los niveles de GRK2 se alteran en pacientes con procesos tumorales o inflamatorios y con enfermedades cardiovasculares/metabólicas. Nuestro objetivo es 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 el inicio o la progresión de estas patologías, utilizando modelos celulares y animales (ratones con expresión alterada de GRK2, de forma inducible o específica de tejido). Así, investigamos cómo alteraciones de GRK2 en los diferentes tipos de células del microambiente tumoral (epiteliales tumorales, endoteliales, inmunes) pueden influir en distintos aspectos de la progresión tumoral (proliferación, supervivencia, senescencia, inestabilidad genómica, angiogénesis o invasión metastásica) a través de sus interacciones con GPCR y con los ejes de señalización Mdm2/p53 o HDAC6/Pin1, entre otros.

Por otra parte, estudiamos el nodo 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.

Los GPCR acoplados a la proteína Gαq desempeñan un papel muy relevante en patologías cardiovasculares y metabólicas y en ciertos tumores. 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 autofagia y estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y en cáncer.

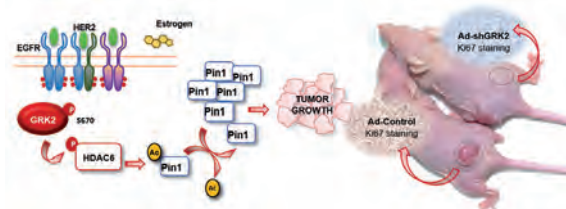


Figura 1. El eje de señalización GRK2/HDAC6/Pin1 contribuye a la progresión del cáncer de mama.

Figure 1. The GRK2/HDAC6/Pin1 signaling axis is a relevant player in breast tumorigenesis.

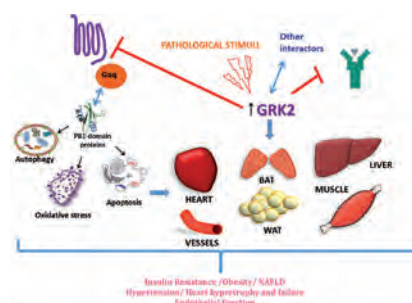


Figura 2. Los nodos GRK2 y Gαq coordinan de forma integrada cascadas de señalización implicadas en patologías cardiovasculares y metabólicas.

Figure 2. The GRK2 and Gαq hubs integrate signaling pathways relevant in cardiovascular and metabolic diseases

Research summary

The overall aim of our research group is the study of the physio-pathological implications of G protein-coupled receptors (GPCRs) signaling networks, with emphasis on the role of the G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) signaling hub and on transduction cascades downstream Gq-coupled GPCR.

In addition to its canonical role as GPCR regulator, GRK2 can directly interact with and/or phosphorylate non-GPCR components of transduction cascades. Combinations of such interactions underlie the participation of GRK2 in basic cellular processes and physio-pathological conditions, such as cell migration and proliferation, angiogenesis or insulin resistance (IR).

GRK2 levels/activity are altered in humans prevalent pathologies such as hypertension, heart failure, metabolic syndrome and in certain tumors. 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 initiation or 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 cell types of the tumor microenvironment (transformed cells, 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, the HDAC6/Pin1 or the Mdm2/p53 signaling axis, among others.

On the other hand, we analyze we the GRK2 hub as a central integrator of signaling cascades relevant to IR related pathologies and comorbidities 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.

Gaq-coupled GPCR play a central role in cardiovascular disease and in certain cancers. We have unveiled novel interactions of Gaq with PB1domain containing proteins such as PKC ζ , and we are investigating the functional impact of this new Gaq interactome in autophagy and oxidative stress processes and in the development of cardiovascular diseases and cancer.

Publicaciones / Publications

Nogués L, Reglero C, Rivas V, Salcedo A, Lafarga V, Neves M, Ramos P, Mendiola M, Berjón A, Stamatakis K, Zhou XZ, Lu KP, Hardison D, Mayor F Jr *, Penela P. * (*, corresponding authors). (2016). *EBioMedicine*. **13**, 132-145.

Singhmar P, Huo X, Eijkelkamp N, Berciano SR, Baameur F, Mei FC, Zhu Y, Cheng X, Hawke D, Mayor F Jr, Murga C, Heijnen CJ, Kavelaars A (2016). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **113**, 3036-3041.

Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., Caballero, Á., García-Hoz, C., Tall, G.G., Klett, J., Michnick, S.W., Mayor, F. *, Ribas, C. * (*, corresponding authors) (2016). *Journal of Biological Chemistry*, **291** 9513-9525.

Lucas E, Vila-Bedmar R, Arcones AC, Cruces-Sande M, Cachofeiro V, Mayor F *, Murga C.* (*, corresponding authors). (2016). *Cardio-vasc Diabetol*. **15**:155-168.

Callejas-Valera JL., Iglesias-Bartolome I., Amornphimoltham P., Palacios-Garcia J., Martin D, Califano J.A., Molinolo A.A., Gutkind J. S. (2016). *Carcinogenesis*, **37**: 1014-1025

Merino, D., Villar, A.V., García, R., Tramullas, M., Ruiz, L., Ribas, C., Cabezudo, S., Nistal, J.F., Hurlé, M.A. (2016). *Cardiovascular Research*, **110**, 331-345.

Martinez-Perez B, Ejarque M, Gutierrez C, Nuñez-Roa C, Roche K, Vila-Bedmar R, Ballesteros M, Redondo-Angulo I, Planavila A, Villarroya F, Vendrell J, Fernández-Veledo S, Megía A (2016). *Transl Res*, **178**:1-12.

Penela P. (2016). *Prog Mol Biol Transl Sci*. **141**:85-140.

Lucas E, Cruces-Sande M, Briones AM, Salaices M, Mayor F Jr, Murga C, Vila-Bedmar R (2015). *Archives of Physiology and Biochemistry*, **121**; 163-177.

Vila-Bedmar R, Cruces-Sande M, Lucas E, Willemen HL, Heijnen CJ, Kavelaars A, Mayor F Jr, Murga C (2015). *Science Signaling* 2015; **8**(386): ra73.

Mayor Jr, F., Vila-Bedmar R, Nogués L, Cruces-Sande M., Lucas E., Rivas V., Reglero C., Penela P., and Murga C. (2016) Cell-Type Specific GRK2 Interactomes: Pathophysiological Implications" In G Protein-Coupled Receptor Kinases (Springer Protocols-Methods in Pharmacology and Toxicology) Springer Science+Business Media, New York, Chapter 6, pp 123-150.

Otras actividades / Other activities

Este grupo de investigación forma parte del CIBER Cardiovascular Federico Mayor: Presidente de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). 2012-2016 /President, Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM), 2012-2016.

Miembro del Consejo Científico de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) / Advisory Board of the Spanish Foundation for Science and Technology (FECYT) (2015-present).

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".

Cristina Murga: Vice-Directora CBMSO / Deputy director CBMSO (2014-)

Catalina Ribas: Coordinadora del Grupo de Señalización Celular de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) /Coordinator of the Cell Signalling Group, Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM). (2016-).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Elisa Lucas Fernández (2015). GRK2 in the cardiovascular disease continuum: Role in hypertension and insulin resistance. Departamento de Biología Molecular – Universidad Autónoma de Madrid. Federico Mayor Menéndez y Cristina Murga.

Pedro Manuel Campos Muelas (2016). Identificación de péptidos y fármacos inhibidores basados en un nuevo mecanismo de inactivación descubierto para p38 MAPK. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.Federico Mayor Menéndez y Cristina Murga.

Patentes / Patents

"Drugs for inhibiting p38 and uses thereof". Inventors: F Mayor jr. (25%), C Murga (25%), P Campos (25%), CJ. Heijnen (11%), A Kavelaars (11%), A Morreale (3%).

Fundación general de la Universidad Autonoma de Madrid.

WO 2013/064714 - PCT/ES2012/070762.

Granted: 10/05/2013. Licensed to Spherium Biomed until 2014.

Granted in USA, August 2015: Drugs for inhibiting p38 and uses thereof, US 9096554.

Biología celular de la inflamación

Cell biology of inflammation



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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
María Cristina Ortega Muños

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Beatriz Marcos Ramiro
Diego García Weber
Diana Santander García
Cristina Cacho Navas

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Barroso Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Carla De la Huerta López
Natalia Colás Algora
Silvia Benito Martínez

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Maiara Marx Luz Fiusa

Resumen de investigación

Los tejidos de organismos complejos están frecuentemente organizados como un conjunto de barreras celulares, lo que les permite compartimentalizar funciones importantes como absorción, secreción, nutrición o protección. Además, estas barreras son esenciales para regular el paso de leucocitos y moléculas durante la respuesta inflamatoria. Investigar los mecanismos moleculares que regulan la integridad de las barreras celulares en respuesta a mediadores inflamatorios, como TNF, es nuestra prioridad en el laboratorio.

El endotelio recubre la cara interna de los vasos, y controla la extravasación de solutos y células desde el torrente sanguíneo. Hemos identificado un conjunto de proteínas endoteliales relacionadas con el tráfico intracelular, cuya expresión se regula por TNF. En estos dos años hemos completado el estudio de una de ellas, la Rho GTPasa RhoB, de localización endosomal, cuyo aumento de expresión reduce la capacidad de las células de extender sus membranas celulares y reformar los contactos intercelulares, debilitando de esta manera la barrera endotelial en un ambiente inflamatorio.

Tras la extravasación, los leucocitos se infiltran en el tejido buscando el foco de inflamación. El hígado es un órgano fundamental que filtra la sangre y está expuesto a gran variedad de insultos inflamatorios. Las barreras epiteliales hepáticas controlan la adhesión linfocitaria a través del receptor de adhesión ICAM-1, cuya expresión y localización es regulada por TNF. ICAM-1 se polariza en la membrana apical mediante una ruta de transcitosis basolateral-apical, cuya maquinaria estamos investigando.

La córnea es un paradigma de tejido organizado en barreras celulares del que se conoce relativamente poco. Gracias a un convenio de colaboración entre el Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz y el CSIC, denominado Endocórnea, estudiamos los mecanismos moleculares que median la disfunción de la barrera endotelial de córnea, lo que causa una pérdida de transparencia de este tejido. Nuestra finalidad es encontrar nuevos tratamientos que preserven este endotelio y reducir la necesidad de un trasplante. Durante estos dos años hemos descubierto que la activación farmacológica de dos Rho GTPasas, RhoA y Rac1, mejora la integridad de la barrera endotelial, por lo que ambas proteínas podrían ser nuevas dianas terapéuticas para mantener la transparencia de la córnea.

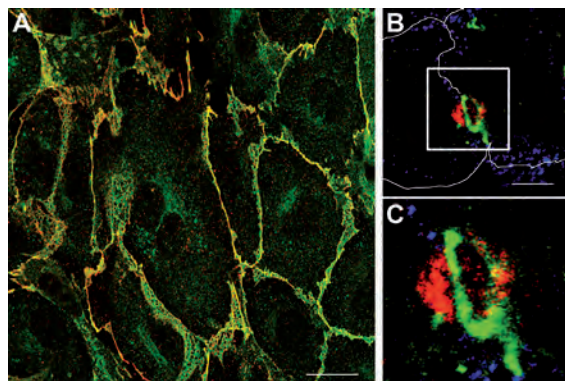


Figura 1. (A) El endotelio vascular constituye la primera barrera celular que los leucocitos tienen que atravesar para llegar al foco de inflamación. Las contactos entre células mediados por las uniones adherentes de VE-cadherina (verde) y β -catenina (rojo). Cuando la barrera endotelial se rompe en respuesta a un mediador inflamatorio necesita reformarse extendiendo protrusiones de membrana para restablecer las uniones adherentes. RhoB endosomal inhibe la extensión de dichas protrusiones. (B,C) Los hepatocitos forman barreras polarizadas que confinan el receptor de adhesión ICAM-1 en su dominio apical, que puede ser localizado con el marcador de uniones intercelulares ZO-1 (verde). ICAM-1 de nueva síntesis es transportado, de hecho, a la membrana basolateral (azul), sin embargo, las células polarizadas los transportan mediante una ruta de transcitosis a la membrana apical donde queda retenido (rojo). (C) es una imagen agrandada de la zona recuadrada en (B).

Figure 1. (A) The vascular endothelium constitutes the first barrier leukocytes traverse to reach the inflammatory focus. Adherens junctions formed by VE-cadherin (Green) and β -catenin (red) are essential to maintain endothelial cell-cell contacts. When inflammatory mediators disrupt the endothelial barrier, cells extend membrane protrusions to re-establish cell-cell junctions. Endosomal RhoB is a negative regulator of these extensions and, therefore, its expression and activity weaken the endothelial barrier. (B,C) Hepatocyte barriers confine ICAM-1 in its apical domain, the bile canaliculus, identified with the junctional marker ZO-1 (green). ICAM-1 is indeed transported to the basolateral domain during its synthesis (blue), from where the receptor is cleared and transported to the apical domain (red). Therefore apicobasal polarity helps reduce leukocyte adhesion to hepatic cells. (C) is an enlarged image of the squared area in (B).

Research summary

Complex organisms organize many tissues as a set of cellular barriers that compartmentalize functions, such as absorption, secretion, nutrition and protection. Cellular barriers are also essential to guide immune cells towards the inflammatory focus. Long-term inflammatory responses are orchestrated by the secretion of soluble factors, such as the cytokine TNF. Our laboratory is interested in how TNF facilitates the recruitment of immune cells to damaged tissue areas by disrupting cellular barriers.

Endothelial barriers line the inner surface of the vascular wall, where they control the passage of cells and solutes between the blood and the parenchyma in the inflamed tissue. We have identified a set of proteins, potentially involved in intracellular trafficking, whose expression is increased by TNF. In these two years we have unveiled the function of one of them, the endosomal GTPase RhoB. RhoB expression prevents the extension of plasma membrane required to reform cell-cell contacts. Therefore, high levels of RhoB in response to TNF weaken the endothelial barrier.

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 into the tissue is essential for immune-surveillance, control of cancer and infections and tissue regeneration. ICAM-1, whose expression and localization are regulated by TNF, is the main adhesion receptor mediating leukocyte haptotaxis in hepatocytes. Polarized hepatocytes confine ICAM-1 in their apical domains, which are not accessible to immune cells. Upon cell depolarization, ICAM-1 is exposed and leukocyte adhesion increases. We are currently studying the protein machinery that mediates basolateral-apical transcytosis required for ICAM-1 polarization.

Finally, thanks to a collaborative project between the Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz and CSIC, called Endocornea, we are investigating the molecular mechanisms involved in the regulation of corneal endothelial barrier function. We have recently found that the pharmacological activation of the RhoGTPases RhoA and Rac1 improves endothelial barrier function, which suggests that these two proteins could be therapeutic targets to preserve corneal transparency and to prevent cornea transplant.

Publicaciones / Publications

Ortega MC, Santander-García D, Marcos-Ramiro B, Barroso S, Cox S, Jiménez-Alfaro I and Millán J. Activation of Rac1 and RhoA preserve corneal endothelial barrier function. (2016). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 6210-6222.

Santander-García D, Ortega MC, Benito-Martínez S, Barroso S, Jiménez-Alfaro I and Millán J. (2016). A human cellular system for analyzing signaling during corneal endothelial barrier dysfunction. *Exp. Eye Res.* **153**, 8-13.

García-Weber D and Millán J. (2016). J. Parallels between single cell migration and barrier formation: the case of RhoB and Rac1 trafficking. *Small GTPases*.

Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón, E, Reglero-Real N, Fernández-Martín L, Alonso MA, Correas I, Ridley AJ and Millán J. (2016). RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* 213:385-402.

Reglero-Real R, García-Weber D and Millán J. (2016). Cellular Barriers after Extravasation: Leukocyte Interactions with Polarized Epithelia in the Inflamed Tissue. *Mediat. Inflamm.*

Bernabé-Rubio M, Andrés G, Casares-Arias J, Fernández-Barrera J, Rangel L, Reglero-Real N, Gershlick DC, Fernández JJ, Millán J, Correas I, Miguez DG, Alonso MA. (2016). New role of the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **214**:259-273.

Rodríguez-Fraticelli AE, Bagwell J, Bosch-Fortea M, Boncompain G, Reglero-Real N, García-León MJ, Andrés G, Toribio ML, Alonso MA, Millán J, Perez F, Bagnat M, Martín-Belmonte F. (2015). Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nat. Cell Biol.* **17**:241-5.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Beatriz Marcos Ramiro (2015). La GTPasa endosomal RhoB regula la recuperación de la barrera endotelial durante la inflamación. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Jaime Millán. (Premio mejor tesis doctoral CBMSO en curso 2015-2016).

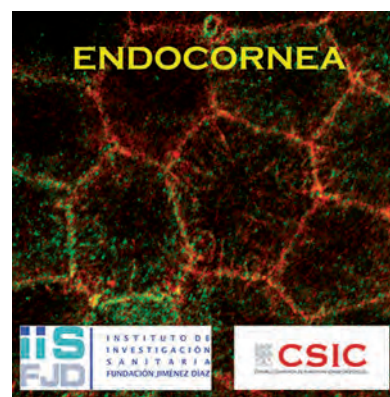


Figura 2. El proyecto Endocórnea estudia los mecanismos moleculares que mantienen la integridad de las uniones intercelulares en situaciones de estrés en el endotelio de la córnea, una monocapa de células que recubre la cara interna de este tejido y que mantiene su transparencia gracias a su función de barrera frente al agua del humor acuoso. Las formas activas de RhoA y Rac1 contribuyen a mantener esta barrera celular. Rojo. Actina filamentosa, verde, el marcador de uniones intercelulares ZO-1.

Figure 2. The Endocornea Project investigates the molecular mechanisms maintaining cell-cell junction integrity during stress in the corneal endothelium, which forms a cell monolayer in the inner side of cornea, which maintains the deturgescence of the corneal stroma. Active RhoA and Rac1 preserve this cellular barrier. Red. Filamentous actin. Green. Tight junction marker ZO-1.

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
(Hasta julio 2015)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Tamara Rosell García
(Desde marzo 2015)

Resumen de investigación

La síntesis y el ensamblaje de los componentes de matriz extracelular constituyen procesos esenciales en la determinación de las propiedades biológicas y biomecánicas de las células y tejidos, un aspecto particularmente importante en el sistema cardiovascular. Los miembros de la familia de las lisil oxidasas catalizan la etapa inicial en la formación de entrecruzamientos covalentes en los colágenos fibrilares y en la elastina, y de esta forma constituyen una familia de enzimas clave en la maduración y estabilización 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 desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

En este contexto, nuestro grupo se ha centrado en el papel de estas proteínas en la formación y progresión de aneurismas de aorta en el síndrome de Marfán y en la respuesta fibrótica del corazón infartado. Nuestros resultados han demostrado que la expresión de ciertas isoformas de LOX se encuentra aumentada en la aorta de pacientes de síndrome de Marfán, así como en modelos de ratón de la enfermedad, y contribuye significativamente a la deposición de colágeno, ejerciendo un efecto protector frente al desarrollo de la dilatación aórtica. Por otro lado, en el contexto del infarto de miocardio, nuestro grupo ha descrito que la expresión de estas proteínas aumenta fuertemente en el tejido cardíaco infartado y que esta inducción se asocia con la deposición de una cicatriz de colágeno maduro y con un notable empeoramiento de la recuperación y la funcionalidad del corazón. Estos resultados demuestran un papel clave de estas enzimas en la respuesta al daño y abren la posibilidad de una aplicación clínica para el tratamiento de determinadas enfermedades cardiovasculares.

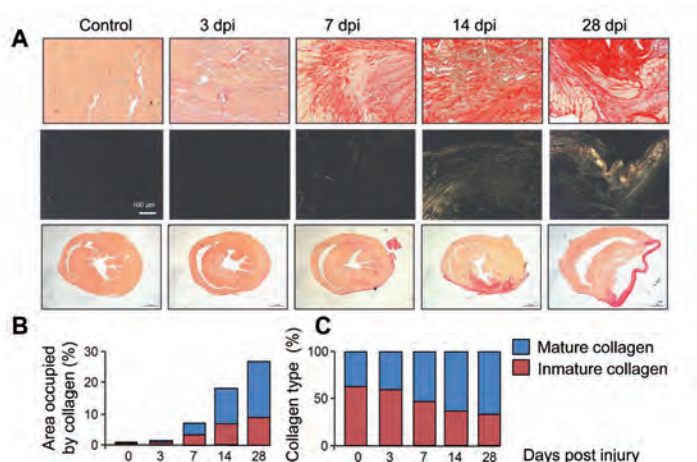


Figura 1. Estudio temporal de la acumulación de colágeno en el corazón de un ratón sometido a infarto de miocardio mediante la ligación de una arteria coronaria. A) Imágenes representativas de la tinción histológica de Rojo Sirio específica para colágeno visualizado con luz transmitida (filas superior e inferior) o luz polarizada (fila intermedia) a diferentes tiempos después del infarto (dpi: days post infarction). B) Análisis del porcentaje de área ocupada por colágeno (B) y de su grado de madurez (C) (inmaduro: verde-amarillo, maduro: rojo-naranja, bajo luz polarizada).

Figura 1. Time course of collagen accumulation in mice subjected to myocardial infarction by ligation of a coronary artery. A) Representative micrographs of collagen-specific Sirius Red staining visualized under brightfield (upper and lower panels) and polarized light (middle panel) at different times upon infarction. Analysis of the percentage of heart area occupied by collagen (B) and the degree of maturity (C) (immature: greenish-yellow, mature: reddish-orange, under polarized light).

Research summary

Proper synthesis and assembly of extracellular matrix components is essential to provide cells and tissues with their biological and biomechanical properties, a circumstance particularly relevant in the cardiovascular system. Lysyl oxidases catalyze the initiation step in the formation of covalent cross-links in fibrillary collagens and elastin, and thereby they constitute a family of enzymes essential for the stabilization and maturation of the extracellular matrix. In our group, we investigate the molecular mechanisms regulating the expression and activity of lysyl oxidases, as well as their pathophysiological relevance in the development of cardiovascular diseases.

Within this context, our group has focused on the role of these proteins in the formation and progression of aortic aneurysms in Marfan syndrome as well as in the fibrotic response of the heart to myocardial infarction. Our results have demonstrated that the aortic tissue from Marfan syndrome patients and mouse models display increased levels of expression of lysyl oxidase enzymes, contributing to significant deposition of collagen that exerts a protective action against the development of the aortic disease. On the other hand, in the context of the myocardial infarction, our group has shown that lysyl oxidase isoforms are strongly upregulated upon heart damage, and that this response is associated with the accumulation of mature collagen fibers in the infarcted area and a significant deterioration of the functional capacity of the heart. These results demonstrate an important contribution of these enzymes to the tissue response upon damage, and point out to a potential applicability of lysyl oxidase-based pharmacological strategies to cardiovascular diseases.

Publicaciones / Publications

Rodríguez-Pascual F, Slatter DA. (2016) Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix. *Scientific Reports*, **6**: 37374.

González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiago O, López-Olafeta MM, Sandoval P, Snabel J, López-Cabrera M, Erler JT, Hanemaaijer R, Lara-Pezzi E, Rodríguez-Pascual F. (2016). Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovascular Research*, **109**:67-78.

Busnadiago O, Gorbenco Del Blanco D, González-Santamaría J, Habashi JP, Calderon JF, Sandoval P, Bedja D, Guinea-Viniegra J, Lopez-Cabrera M, Rosell-Garcia T, Snabel JM, Hanemaaijer R, Forteza A, Dietz HC, Egea G, Rodríguez-Pascual F (2015). Elevated expression levels of lysyl oxidases protect against aortic aneurysm progression in Marfan syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **85**:48-57.

Grau-Bové X, Ruiz-Trillo I, Rodríguez-Pascual F (2015). Origin and evolution of lysyl oxidases. *Scientific Reports*, **5**:10568.

Crosas-Molist E, Meirelles T, López-Luque J, Serra-Peinado C, Selva J, Caja L, Del Blanco DG, Uriarte JJ, Bertran E, Mendizábal Y, Hernández V, García-Calero C, Busnadiago O, Condom E, Toral D, Castellà M, Forteza A, Navajas D, Sarri E, Rodríguez-Pascual F, Dietz HD, Fabregat I, Egea G (2015). Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Changes in Patients with Marfan. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **35**:960-72.

Lara-Pezzi E, Dworatzek E, Rodríguez-Pascual F (2015). Workshop on cardiovascular extracellular matrix in health and disease in Baeza, Spain. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, **8**:2.

Puig M, Lugo R, Gabasa M, Gimenez A, Velasquez A, Galgoczy R, Ramirez J, Gomez-Caro A, Busnadiago O, Rodríguez-Pascual F, Gascon P, Reguart N, Alcaraz J (2015). Matrix Stiffening and Beta1 integrin Drive Subtype-specific Fibroblast Accumulation in Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*, **13**:161-73.

Busnadiago O, Loureiro-Alvarez J, Sandoval P, Lagares D, Dotor J, Perez-Lozano ML, López-Armada MJ, Lamas S, López-Cabrera M, Rodríguez-Pascual F (2015). A pathogenetic role for endothelin-1 in peritoneal dialysis-associated fibrosis. *Journal of American Society of Nephrology*, **26**:173-82.

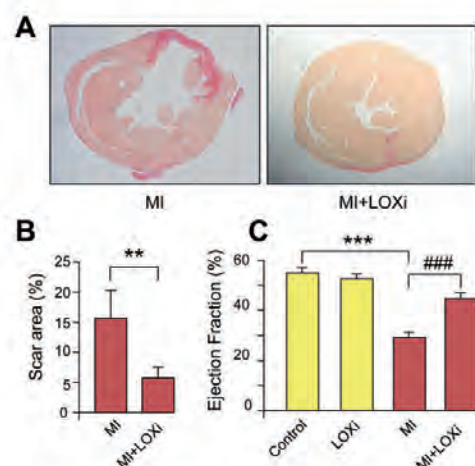
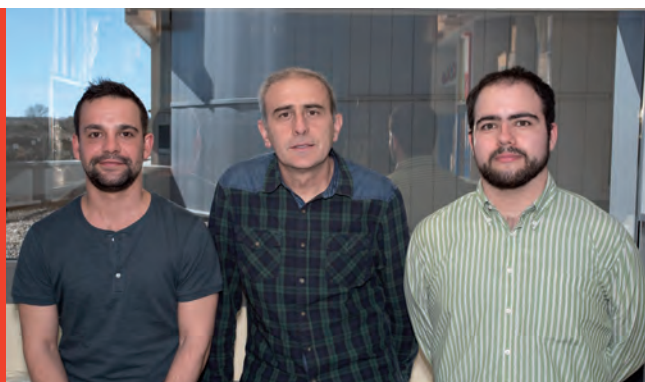


Figura 2. La inhibición de las lisil oxidasas (LOX) atenúa la fibrosis cardíaca y mejora la función del corazón. A) Imágenes representativas de tinciones de Rojo Sirio en ratones infartados tratados con un inhibidor de LOX (LOXi) o vehículo. Análisis del área del corazón ocupado por la cicatriz de colágeno de acuerdo a la tinción histológica (B) y de la función cardíaca expresada como fracción de eyección medida mediante ecocardiografía en ratones control y sometidos a infarto tratados con un inhibidor de LOX (LOXi) o vehículo.

Figure 2. Lysyl oxidase (LOX) inhibition attenuates cardiac fibrosis and improves heart function. A) Representative whole tissue sections from infarcted mice treated with a LOX inhibitor (LOXi) or vehicle and stained with Sirius Red. Analysis of the heart area occupied by the scar as estimated by collagen staining (B) and of the cardiac function expressed as ejection fraction measured by echocardiography in control and infarcted mice treated with a LOX inhibitor (LOXi) or vehicle.

Óxido nítrico en la respuesta inmune adaptativa

Nitric oxide and adaptive immune responses

Jefe de Línea / Group Leader:

Juan Manuel Serrador Peiró

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Almudena García-Ortiz

Ángel Bago

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Ángel Castillo

Resumen de investigación

Nuestras investigaciones se centran en el estudio del papel desempeñado por el óxido nítrico (NO) en la regulación de la respuesta inmune adaptativa asociada con las enfermedades de origen autoinmune y alérgico. Los linfocitos T son importantes reguladores de la inmunidad adaptativa, reconociendo a través de su receptor (TCR) antígenos en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Durante el reconocimiento antigénico, la membrana plasmática de ambos tipos celulares se une estrechamente formando la sinapsis inmune (SI), una estructura dinámica mantenida por el citoesqueleto de actina. La agregación de TCRs en la SI induce el reclutamiento de otras moléculas de señalización, entre las que destaca la proteína quinasa C- θ (PKC- θ), implicada en la transmisión de las señales requeridas para la diferenciación Th17 y Th2. PKC- θ forma microagregados que son transportados hacia la SI siguiendo el flujo retrogrado del citoesqueleto de actina. Hemos investigado los mecanismos por los que actina regula la localización de PKC- θ en la SI. Nuestros resultados muestran que eNOS co-localiza con actina en la periferia de la SI, y que la producción de NO dificulta la translocación de PKC- θ a la zona central, aumentando su activación. Además, hemos encontrado que eNOS S-nitrosila actina en la Cys374, reduciendo su polimerización y flujo retrogrado desde zonas periféricas a centrales de la SI. Se ha propuesto que PKC- θ juega un papel dual en la función de los linfocitos T, dificultando la supresión por parte de las células reguladoras pero favoreciendo la activación de las efectoras. Nuestros hallazgos sugieren que, al inhibir la polimerización de actina desde zonas periféricas, eNOS reduce el transporte de microagregados de PKC- θ hacia zonas centrales de la SI, promoviendo su activación. En la actualidad estudiamos si la actividad de eNOS en la SI puede regular los procesos de diferenciación celular dependientes de PKC- θ .

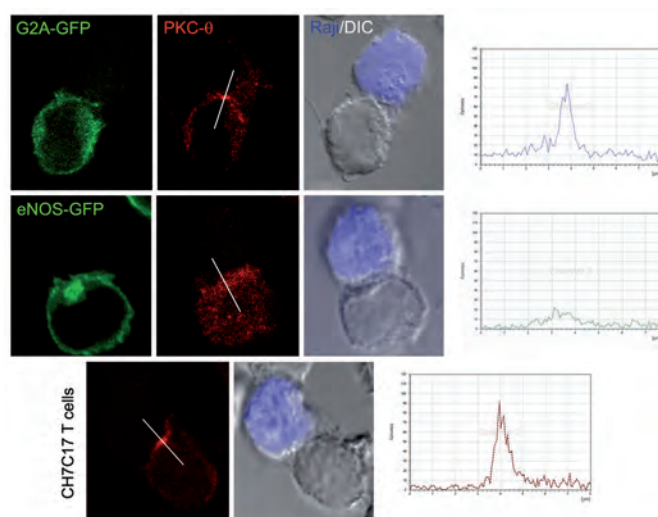


Figura 1. eNOS controla la concentración de PKC- θ en la sinapsis inmune. Localización de PKC- θ (rojo) y eNOS-GFP o G2A-GFP (verde) en la sinapsis inmune de células T CH7C17, eNOS y G2A activadas con células APC Raji pulsadas con superantígeno B (azul). A la derecha se muestran los perfiles de fluorescencia de PKC- θ a lo largo de las líneas blancas.

Figure 1. eNOS controls the coalescence of PKC- θ at the immune synapse. Localization of PKC- θ (red) and eNOS-GFP or G2A-GFP (green) in the immune synapse of CH7C17, eNOS and G2A T cells conjugated with superantigen B-pulsed Raji APCs (blue). On the right, PKC- θ fluorescence profiles along the white lines are shown.

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 degenerative damage in autoimmune-related diseases, chiefly exploring their cellular and molecular basis. T cells are essential regulators of adaptive immunity, they recognize foreign antigens displayed on the surface of antigen presenting cells (APC) by way of their T cell antigen receptor (TCR). During antigen recognition on APC the plasma membrane of both cell types closely apposes forming the immunological synapse (IS), a dynamic structure sustained by the actin cytoskeleton. At the IS, the TCR recruits signalling molecules, such as protein kinase C- θ (PKC- θ), which is involved in the transmission of activation signals for Th2 and Th17 cell differentiation during allergic and autoimmune diseases, respectively. PKC- θ , together with other signalling proteins, forms microclusters that are translocated centripetally towards the center of the IS following the retrograde movement of the actin cytoskeleton. We have investigated the mechanisms by which actin organizes PKC- θ at the center of the IS. We have found that eNOS co-localizes with F-actin in the periphery of the IS, and that NO from eNOS disturbs the coalescence of PKC- θ at the central region of the IS, increasing its activation. Moreover, eNOS S-nitrosylates β -actin on Cys474, and reduces actin polymerization and retrograde flow from peripheral to central areas of the IS. A dual role for the localization and activation of PKC- θ at the IS fostering effector T cell functions but disturbing the suppressor activities of regulatory T cells has been previously proposed. Our findings suggest that by influencing the actin-based centripetal translocation of PKC- θ -containing microclusters towards the center of the IS, eNOS promotes T cell activation. We are currently studying whether NO from eNOS might regulate PKC- θ -dependent T cell fate decisions at the IS.

Publicaciones / Publications

Anta, B., Pérez-Rodríguez, A., Castro, J., García-Domínguez, C.A., Ibiza, S., Martínez, N., Durá, I.M., Gragera, T., Peña-Giménez, D., Yunta, M., Crespo, P., Serrador, J.M., Pérez-Sala, D., Santos, E., Oliva J.L., and Rojas, J.M. (2016). PGA1-induced apoptosis involves specific activation of H-Ras and N-Ras in cellular endomembranes. *Cell Death Dis.* 7:e2311.

Otras actividades / Other activities

Miembro Asociado de "Faculty of 1000": Sánchez-Madrid F and Serrador JM: F1000Prime Recommendation of [Tooley AJ et al., Nat Cell Biol 2009, 11(1):17-26]. In F1000Prime, 02 Jan 2009; DOI: 10.3410/f.1138988.596092. F1000Prime.com/1138988#eval596092; Sánchez-Madrid F and Serrador JM: F1000Prime Recommendation of [Blagih J et al., Immunity 2015, 42(1):41-54]. In F1000Prime, 05 May 2015; DOI: 10.3410/f.725320476.793506354. F1000Prime.com/725320476#eval793506354; Sánchez-Madrid F and Serrador JM: F1000Prime Recommendation of [Kumari S et al., elife 2015, 4]. In F1000Prime, 05 May 2015.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Almudena García-Ortiz (2016). Papel de eNOS en la regulación de PKC- θ en la Sinapsis Inmune de los linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Juan M. Serrador.

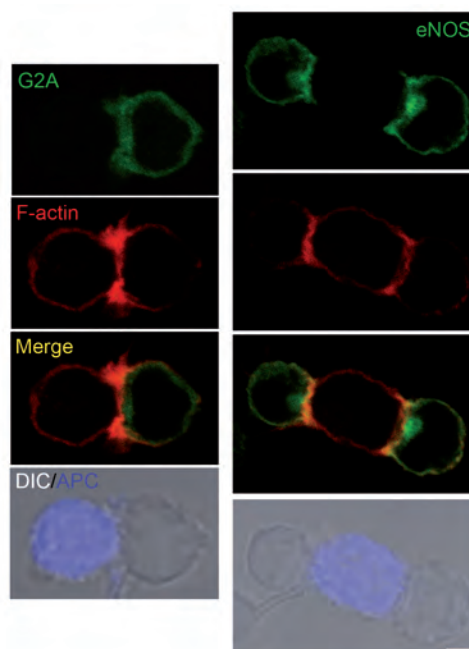


Figura 2. eNOS co-localiza con F-actina y reduce la polimerización de actina en la sinapsis inmune. Localización de F-actina marcada con faloidina-Alexa568 (rojo) y G2A- o eNOS-GFP (verde) en células T CH7C17 activadas con células APC Raji pulsadas con superantígeno B (azul). Barra=4 μ m.

Figure 2. eNOS co-localizes with F-actin and reduces actin polymerization at the immune synapse. Localization of phalloidin-Alexa568-labeled F-actin (red) and G2A- or eNOS-GFP (green) in CH7C17 T cells conjugated with superantigen B-pulsed Raji APCs (blue). Bar=4 μ m.

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
Margaret Lario Martínez
Marta Mosquera Sáiz
M^a Jesús García León

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Olga Lancho Medina
Alba Murcia Ceballos

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Juan Alcain Sánchez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Pablo Hernández Malmierca
Esther Rodríguez Correa
Elena García Martínez
Ana Belén Gallego de Miguel
Viktor Maier

Resumen de investigación

Nuestro interés es entender los mecanismos que determinan el compromiso de los progenitores hematopoyéticos humanos al linaje de linfocitos T en el timo, con dos objetivos principales: 1) descifrar modificaciones del programa madurativo de los progenitores intratímicos que conducen a la generación de una leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) y 2) caracterizar las alteraciones del microambiente tímico asociadas a la involución del timo dependiente de la edad, los efectos iatrogénicos y/o la aplasia tímica, que deben ser el foco de nuevas estrategias regenerativas. El objetivo final es identificar las dianas moleculares óptimas para desarrollar terapias específicas y obtener la prueba de concepto de su eficacia en modelos preclínicos *in vivo*, para su posterior traslado a la clínica.

Nuestras aproximaciones genéticas de pérdida y ganancia de función, en combinación con ensayos de diferenciación celular y modelos de enfermedad en ratones humanizados, demuestran la participación esencial de Notch1 en el desarrollo fisiológico y patológico de las células T humanas, así como su función reguladora de la homeostasis y el envejecimiento de las células epiteliales tímicas. La regulación espaciotemporal de la señalización mediada por Notch genera nichos intratímicos discretos selectivos para distintos linajes hematopoyéticos, y controla la disminución de la funcionalidad del estroma tímico asociada a la edad y, por tanto, la aparición de inmunosenescencia. Hemos identificado diversas dianas moleculares de Notch1 que participan en: 1) la expansión de células pre-T normales y patológicas, 2) las interacciones entre células pre-leucémicas y el microambiente de la médula ósea, que son esenciales para el inicio y la progresión de la T-ALL, y 3) la involución del timo asociada a la edad. Nuestros datos ponen de manifiesto la importancia de la manipulación de las dianas de Notch identificadas como una prometedora estrategia terapéutica frente a la T-ALL y la inmunosenescencia.

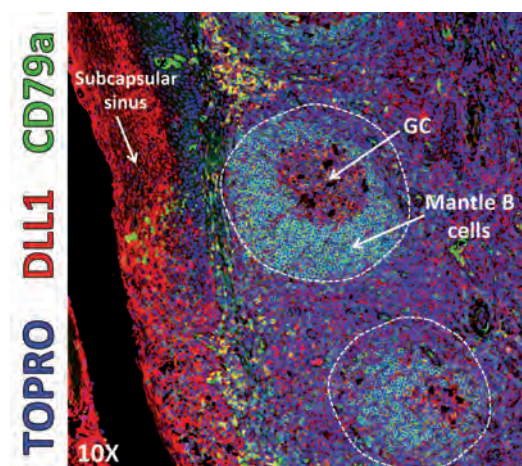


Figura 1. Expresión del ligando de Notch DLL1 en amígdala humana. DLL1: Ligando delta-like 1. GC: Centro Germinal.

Figure 1. Expression of DLL1 Notch ligand in human tonsil. DLL1: Delta-like ligand 1. GC: Germinal Centre.

Research summary

Our group is interested in understanding the mechanisms determining human hematopoietic stem and progenitor cell commitment to the T-cell lineage. In the last years, our research has focussed on the identification of cellular and molecular players involved in the generation of functional T cells in the human thymus with two main goals: 1) deciphering the particular changes of the T-cell developmental program undertaken by thymus-seeding progenitors that lead to the generation of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and 2) characterizing the alterations of the thymic microenvironment that parallel age-related thymic involution, iatrogenic effects, and/or thymic aplasia, which must be the focus of novel regenerative approaches. The ultimate goal is identifying key molecular targets for developing specific therapeutic strategies, and to provide proof of concept of their suitability in preclinical models for later translation to the clinic.

Our loss- and gain-of-function genetic approaches, *in vitro* cell differentiation assays and humanized mouse models of disease, have highlighted the prevalent role that Notch1 signaling plays as a key pathway involved in both physiological and pathological human T cell development, and also as a crucial regulator of thymic epithelial cell homeostasis and ageing. We found that spatiotemporal regulation of Notch1 signaling guides the formation of particular thymus niches that support the specification of distinct hematopoietic cell types, and also controls the age-associated functional decline of the thymus microenvironment and, thus, the emergence of immunosenescence. Collectively, we have provided critical information of key Notch1 targets specifically involved in: 1) expansion of normal and pathological pre-T cells, 2) interactions between pre-leukemic T-ALL cells and the bone marrow microenvironment, which are mandatory for leukemia-initiating cell generation and progression, and 3) age-associated involution of the human thymus. Therefore, our data highlight the relevance of Notch target manipulation as a promising therapeutic strategy for both T-ALL and immunosenescent patients.

Publicaciones / Publications

Rodríguez, R.M., Suarez-Alvarez, B., Mosén-Ansorena, D., García-Peydró, M., Fuentes, P., García-León, M.J., Gonzalez-Lahera, A., Macias-Camara, N., Toribio, M.L., Aransay, A.M. and Lopez-Larrea, C. (2015). Regulation of the transcriptional program by DNA methylation during human $\alpha\beta$ T-cell development. *Nucleic Acids Res.* **43**:760-774.

Garcillán, B., Marin, A.V., Jiménez-Reinoso, A., Briones, A.C., Muñoz-Ruiz, M., García-León, M.J., Gil, J., Allende, L.M., Martínez-Naves, E., Toribio, M.L. and Regueiro, J.R. (2015). $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Diagnosis of Human T Cell Receptor Immunodeficiencies. *Front Immunol.* **6**:20.

Rodríguez-Fraticelli, A.E., Bagwell, J., Bosch-Fortea, M., Boncompain, G., Reglero-Real, N., García-León, M.J., Andrés, G., Toribio, M.L., Alonso, M.A., Millán, J., Perez, F., Bagnat, M. and Martín-Belmonte F. (2015). Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nat Cell Biol.* **17**, 241-250.

Ayllón, V., Bueno, C., Ramos-Mejía, V., Navarro-Montero, O., Prieto, C., Real, P.J., Romero, T., García-León, M.J., Toribio, M.L., Bigas, A. and Menendez, P. (2015). The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematopoietic progenitors and regulates their hematopoietic fate. *Leukemia.* **29**,1741-1753.

Ogando, J., Tardáguila, M., Díaz-Alderete, A., Usategui, A., Miranda-Ramos, V., Martínez-Herrera, D.J., de la Fuente, L., García-León, M.J., Moreno, M.C., Escudero, S., Cañete, J.D., Toribio, M.L., Cases, I., Pascual-Montano, A., Pablos, J.L. and Mañes, S. (2016). Notch-regulated miR-223 targets the aryl hydrocarbon receptor pathway and increases cytokine production in macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep.* **6**, 20223.

Tremblay, C.S., Brown, F.C., Collett, M., Saw, J., Chiu, S.K., Sonderegger, S.E., Lucas, S.E., Alserihi, R., Chau, N., Toribio, M.L., McCormack, M.P., Chircop, M., Robinson, P.J., Jane, S.M. and Curtis, D.J. (2016). Loss-of-function mutations of Dynamin 2 promote T-ALL by enhancing IL-7 signalling. *Leukemia.* **30**,1993-2001.

Toribio, M.L. Modeling altered human T-cell development. (2016). *Blood* **128**,743-745.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Marta Mosquera Sáiz (2015). Estudio de la contribución de la vía de Notch1 y sus efectores moleculares a la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL). Universidad Autónoma de Madrid. Sobresaliente *cum laude*.

María Jesús García León (2016). Expression and functional analysis of the Notch signaling pathway within the thymus microenvironment. Universidad Autónoma de Madrid. Sobresaliente *cum laude*.

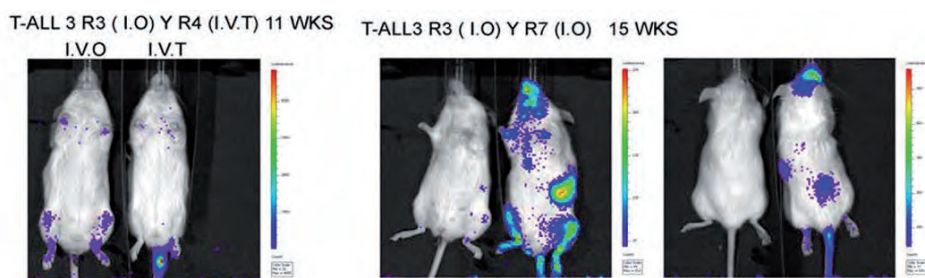


Figura 2. Análisis de la progresión tumoral *in vivo* en un modelo de xenotrasplante de células primarias de leucemia T-ALL humana modificadas genéticamente para expresar la proteína luciferasa.

Figure 2. Analysis of *in vivo* tumor progression of luciferase-expressing human primary T-ALL cells upon xenotransplantation into immunodeficient mice.

Homeostásis metabólica

Metabolic homeostasisJefe de Línea / *Group Leader:*

Ignacio Vicente-Sandoval

Personal Científico /

Scientific Staff:

Diego Pulido Vega

Vassiliki Lalioti

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Manuela Pérez Berlanga

Resumen de investigación

La enfermedad de Wilson (EW), una enfermedad rara con una prevalencia mucho más alta de la reconocida, es causada por variaciones genéticas en el transportador hepático de cobre (Cu^+ ATP7B que bloquean la eliminación del Cu^+ por el hígado. En mamíferos la eliminación del exceso Cu^+ está estrechamente unida a la translocación de ATP7B al canalículo biliar (CB), translocación que es activada por el aumento de los niveles del metal en el hepatocito. Los desórdenes del tráfico de ATP7B producidos por alteraciones en su plegamiento y por la destrucción de las señales contenidas en él, alteran su función y producen la EW. Por otra parte, las variaciones genéticas que afectan los mecanismos que leen las señales de tráfico y funcionan en el transporte de proteínas alteran el tráfico de ATP7B y de otras proteínas compañeras de tráfico, causando síndromes pleomórficos resultantes de una disfunción múltiple. Consecuentemente, la caracterización de la vía de transporte de ATP7B regulada por Cu^+ es esencial para identificar las variaciones genéticas que causan las diferentes formas de la EW y las cu-protoxicosis pleomórficas. El trabajo realizado en los últimos cuatro años nos ha permitido caracterizar la vía de transporte de ATP7B al CB, vía que incluye su transporte desde la TGN a la membrana plasmática basolateral y posteriormente su translocación al CB. Nuestro estudio no encuentra ninguna implicación de los lisosomas y cuestiona el modelo que propone que la eliminación del Cu^+ por la bilis es llevada a cabo por exocitosis lisosomal. Actualmente estamos finalizando la caracterización de la vía retrógrada de transporte de ATP7B desde el CB a la TGN en ausencia de Cu^+ (fig.1) y reproduciendo en ratones los estudios del transporte anterógrado de ATP7B al CB, centrándonos en el estudio de si ATP7B funciona en el CB. Además, estudiamos el papel del complejo CCC/Retrómero/WASH en los movimientos anterógrado y retrógrado de ATP7B a través del dominio basolateral del hepatocito y cómo estos son regulados por el Cu^+ .

En conexión con el hallazgo de que el transportador de glicerolípidos ESyt1 está implicado en la captura de glucosa estimulada por insulina en el adipocito, estudiamos en estos el papel funcional de ESyt3 en la biogénesis de las gotas de grasa. Separadamente, en *D. Melanogaster* estudiamos el papel de su única ESyt en el funcionamiento de Ras y en el control por este de la producción de ecdisoma, hormona clave en el desarrollo del insecto.

En los estudios del polímero IMPDH2, oscilante entre las formas toroide y bastón, encontramos que el bastón se inserta en el "midbody" de las células en citocinesis y que células IMPDH2 $-/-$ muestran defectos en la culminación de la mitosis formándose dobles y tétradas (fig.2). Este estudio se complementa con el análisis de las bases estructurales de la señalización del Ca^{++} mediado por sorcina [2].

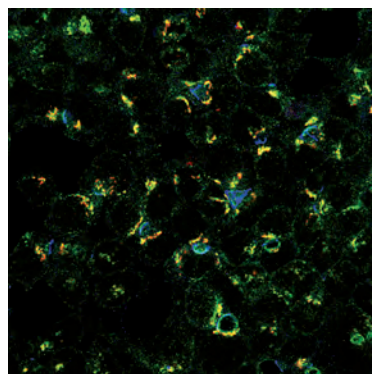


Figura 1. El retorno de ATP7B (verde) desde el canalículo biliar (azul) a la red trans del Golgi (rojo/amarillo) tras ser incubada la célula con el quelante de Cu^+ neocupreína.

Figure 1. ATP7b (green) returns from the bile canalculus (blue) to the trans-Golgi network (red/yellow) following the removal of Cu^+ .

Research summary

Wilson's disease (WD) is a rare disease with a prevalence much higher than previously thought. Genetic variations that target the copper (Cu^+) transporter p-ATPase ATP7B disrupt the elimination of Cu^+ by the liver. Elimination of excess Cu^+ by the liver is tightly linked to the Cu^+ -regulated translocation of ATP7B from the trans-Golgi network (TGN) to the bile canaliculus (BC) in the polarized hepatocyte. Trafficking disorders produced by alterations in the folding of ATP7B and destruction of the embedded trafficking signals ablate its function and create syndromes identical or similar to the canonical form of WD. Moreover, genetic variations that target the mechanisms of protein transport simultaneously hinder the distribution of Atp7b and other trafficking proteins, therefore causing pleomorphic syndromes resulting from a multifunctional dysfunction. Consequently, characterization of the pathways of (Cu^+)-regulated transport of ATP7B in the hepatocyte is essential to identify the genetic variations that cause WD and the pleomorphic cuprotoxicosis. The studies done in the last four years have led us to define a new path of ATP7B transport in the hepatocyte. Our results show that ATP7B is transported from the TGN to the basolateral membrane and then by transcytosis to the BC [1]. We find no evidence of lysosomal involvement and therefore of Cu^+ excretion by lysosomal exocytosis [1]. We are now in the process of reproducing in mice the transport studies performed in hepatoma cells and in completing the characterization of the retrograde transport of ATP7B from the BC to the TGN in the absence of Cu^+ (fig.1), pathway that flows through basolateral endosomes. In the context of these studies we are investigating the role of the CCC/retromer/WASH hub in the sorting and trafficking of ATP7B through the basolateral domain of the hepatocyte and its regulation by Cu^+ .

In connection with the finding that the transporter of glycerolipids ESyt1 is involved in the insulin-stimulated uptake of glucose by the adipocyte, we are now studying the role of Esyt3 in the biogenesis of lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. The role of ESyt in the regulation of the Ras activity and the production of ecdysone is being studied in *D. Melanogaster*.

In separate studies, the exam of the IMPDH2 toroidal/rod structure in mitotic cells has revealed its insertion into the mid-body of cells in cytokinesis and a cause relationship with the formation of cell duplexes and tetrads in IMPDH2 $^{-/-}$ fibroblasts (fig.2). The study of the regulation of calcium homeostasis by sorcin and its role in the activation of mitosis and cytokinesis [2] is now continued with the analysis of the structural basis of sorcin-mediated calcium-dependent signal transduction.

Publicaciones / Publications

Lalioti V, Peiro R, Perez-Berlanga M et al. (2016) Basolateral sorting and transcytosis define the Cu^+ -regulated translocation of ATP7B to the bile canaliculus. *J Cell Sci*; **129**: 2190-2201.

Ilari A, Fiorillo A, Poser E et al. (2015) Structural basis of Sorcin-mediated calcium-dependent signal transduction. *Sci Rep*; **5**: 16828.

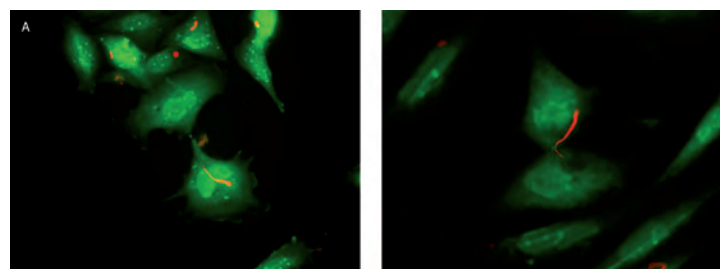


Figura 2. El toroide IMPDH2 (rojo) dirigiéndose e introduciéndose en el "midbody" de células en citocinesis.

Figure 2. The toroid/rod IMPDH2 (red) heading and entering the midbody in cells undergoing cytokinesis.

Microdominios de membrana ricos en tetraspaninas en vesículas extracelulares y adhesión y migración celular

Tetraspanin-enriched membrane microdomains in extracellular vesicles and cell adhesion and migration



Jefe de Línea / *Group Leader*: Técnica de Investigación /
 María Yáñez-Mó
Technical Assistance:
 Soraya López Martín

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
 Zoraida Andreu Martínez
 Carla Mazzeo

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
 Henar Suárez Montero
 Estefanía Lozano Andrés

Estudiantes /
Undergraduate Students:
 Víctor Toribio Serrano

Resumen de investigación

Nuestro grupo está centrado en el estudio y caracterización de microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs), plataformas de membrana implicadas en procesos de adhesión célula-célula y migración celular.

Además, las tetraspaninas se encuentran entre las proteínas más abundantes en vesículas extracelulares (EVs). Las vesículas extracelulares, que incluyen microvesículas, ectosomas, micropartículas y exosomas, representan un novedoso mecanismo de comunicación intercelular ya que actúan como vehículos portadores de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos bioactivos y material genético. En nuestro laboratorio pretendemos sacar partido de las herramientas que tenemos frente a las tetraspaninas y sus moléculas asociadas (metaloproteinasas y receptores de adhesión) para estudiar su papel funcional en la biogénesis, la regulación de su tropismo, adhesión y captación, así como de la función de las EVs en la célula diana. Esta información será crítica para la optimización de aquellas terapias basadas en EVs, ya que revelarán nuevas dianas terapéuticas para bloquear su secreción, disminuir su potencial metastásico o angiogénico, o para aumentar su estabilidad y sus propiedades inmunoregulatoras. También estamos abordando el uso de las herramientas basadas en las tetraspaninas para el desarrollo de dispositivos de detección de exosomas y para la generación de exosomas artificiales.

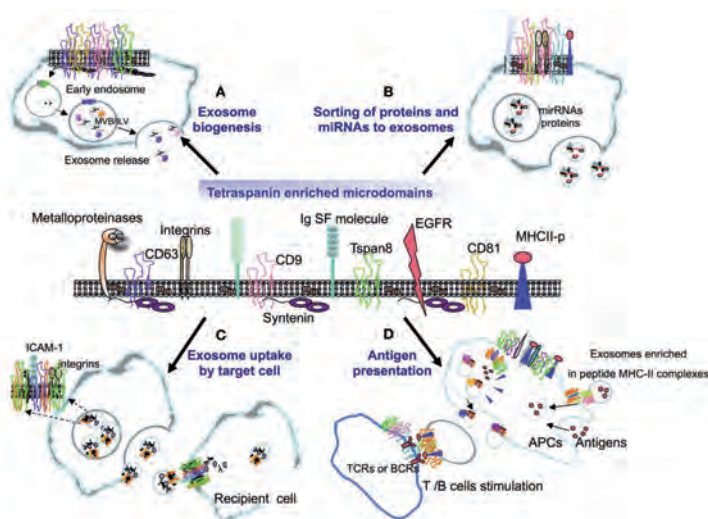


Figura 1. Tetraspaninas en la formación de vesículas extracelulares y su función. Las tetraspaninas tienen la capacidad de interaccionar con distintos receptores y moléculas de señalización en la membrana plasmática, conformando microdominios especializados (TEM), que pueden jugar un papel en la biogénesis de las vesículas extracelulares (A), la selección del cargo de los exosomas (tanto proteico como miRNAs) (B), la unión y captación de los exosomas por parte de la célula diana (C), o la capacidad de los exosomas de presentar antígeno en el contexto de una respuesta inmune (D). De Andreu Z and Yáñez-Mó M. *Front Immunol.* 2014 Sep 16;5:442.

Figure 1. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Tetraspanins have the capacity to interact with several receptors and signaling molecules at the membrane, organizing specialized tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) that may play a role in (A) EV biogenesis, (B) the selection of exosome cargo (proteins and miRNAs), (C) the binding and uptake of exosomes by target cells, or (D) the ability of exosomes to present antigen in the context of an immune response. From Andreu Z and Yáñez-Mó M. *Front Immunol.* 2014 Sep 16;5:442.

Research summary

Our group is focused on the characterization of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs), specialized membrane platforms involved in cell-cell adhesion and migration processes.

In addition, tetraspanin proteins are among the most abundant proteins on extracellular vesicles (EVs). Extracellular vesicles, including microvesicles, ectosomes, shedding vesicles, microparticles and exosomes, represent a novel mechanism of intercellular communication as vehicles for intercellular transfer of functional membrane and cytosolic proteins, lipids, and RNAs. In our group, we aim at profiting from all the tools against tetraspanin molecules and their associated partners (metalloproteinases and adhesion receptors) we have in the lab to study their functional role in the biogenesis, the regulation of their tropism, adhesion and uptake, and in the function of EVs in the target cells. This information will be critical for the optimization of those therapies based on EVs, since it will reveal novel therapeutic targets to block their secretion, diminish their metastatic or angiogenic capacities, or augment their stability and immunoregulatory potential. We are also pursuing the use of tetraspanin-based tools in the design of exosome detection devices and synthetic exosome mimetics.

Publicaciones / Publications

Oliveira-Rodríguez M, López-Cobo S, Reyburn HT, Costa-García A, López-Martín S, Yáñez-Mó M, Cernuda-Morollón E, Paschen A, Valés-Gómez M, Blanco-López MC. (2016) Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. *J Extracell Vesicles*. 5:31803.

Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, Lamana A, Marazuela M, González-Alvaro I, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Yáñez-Mó M. (2016) Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J Extracell Vesicles*. 5:31655.

Fais S, O'Driscoll L, Borrás FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, Carvalho J, Cordeiro da Silva A, Del Portillo H, El Andaloussi S, Ficko Trček T, Furlan R, Hendrix A, Gursel I, Kralj-Iglic V, Kaeffer B, Kosanovic M, Lekka ME, Lipps G, Logozzi M, Marcilla A, Sammar M, Llorente A, Nazarenko I, Oliveira C, Pocsfalvi G, Rajendran L, Raposo G, Rohde E, Siljander P, van Niel G, Vasconcelos MH, Yáñez-Mó M, Yliperttula ML, Zarovni N, Zavec AB, Giebel B. (2016) Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano*. 10:3886-99.

Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, Maillou V, Beltrán-Breña P, Calle A, Redruello A, López-Martín S, Gutiérrez-Adán A, Yáñez-Mó M, Ramírez MÁ, Rizos D. (2016) Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One*. 11:e0148083.

Reyes R, Monjas A, Yáñez-Mó M, Cardenas B, Morlino G, Gilsanz A, Machado-Pineda Y, Lafuente E, Monk P, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. (2015) Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9. *Biochim Biophys Acta*. 1853:2464-80.

Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Liné A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 4:27066.

Martínez del Hoyo G, Ramírez-Huesca M, Levy S, Boucheix C, Rubinstein E, Minguito de la Escalera M, González-Cintado L, Ardavin C, Veiga E, Yáñez-Mó M, Sánchez-Madrid F. (2015) CD81 controls immunity to *Listeria* infection through rac-dependent inhibition of proinflammatory mediator release and activation of cytotoxic T cells. *J Immunol*. 194:6090-101.

Montazeri M, Sanchez-Lopez JA, Caballero I, Maslehat Lay N, Elliott S, López-Martín S, Yáñez-Mó M, Fazeli A. (2015) Activation of Toll-like receptor 3 reduces actin polymerization and adhesion molecule expression in endometrial cells, a potential mechanism for viral-induced implantation failure. *Hum Reprod*. 30:893-905.

Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, Park HT, Seo JH, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka M, van Balkom BW, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borrás FE, Buée L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekström K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jørgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Möller A, Morhaim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F, Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stępień E, Tahara H, Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yáñez-Mó M, Youn H, Zeidler R, Gho YS. (2015) EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 31:933-9.

Otras actividades / Other activities

Contrato de investigación y desarrollo con Immunostep S.L.

Secretaría de la asociación sin ánimo de lucro "Grupo español de innovación e investigación en vesículas extracelulares GEIVEX".

Miembro del management committee de la acción COST2012 MeHad.

Miembro del Local Organizing Committee del 2016 meeting de la International Society of Extracellular Vesicles (ISEV). Rotterdam Mayo 2016.

IP de grupo consolidado del Instituto de Investigaciones Sanitarias Princesa (IIS-IP).

Miembro de la comisión de investigación del IIS-IP.

Representante electo del colectivo de PDI no permanente en Junta de Facultad de Ciencias de la UAM. Comisión de Calidad.

Representante electo del colectivo de PDI no permanente en claustro de la UAM. Comisión delegada de Investigación.

Premio a Víctor Toribio Serrano al mejor poster en el III simposio internacional GEIVEX "Therapeutic applications of Extracellular Vesicles" San Sebastián 29-30 Septiembre 2016.

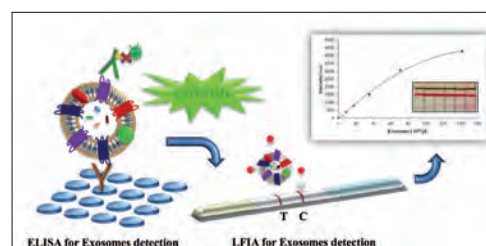


Figure 2. Esquema de sistemas de detección de los exosomas presentes en fluidos biológicos de pacientes basados en anticuerpos frente a tetraspaninas. De Oliveira-Rodríguez et al., *J Extracell Vesicles* (2016) 5:31803.

Figure 2. Scheme of exosome detection devices based on anti-tetraspanin antibodies, to be used on biological fluids from patients. From Oliveira-Rodríguez et al., *J Extracell Vesicles* (2016) 5:31803.



14 Grupos / 14 Groups

- | | | |
|----|-----------------------------------|---|
| 66 | ANTONIO ALCAMÍ PERTEJO | Modulación de la respuesta inmune por virus
<i>Viral modulation of the immune response</i> |
| 68 | JOSÉ M. ALMENDRAL DEL RÍO | Evolución, patogenia y potencial anti-cáncer de los virus ssDNA
<i>ssDNA virus evolution, pathogenesis, and anti-cancer potencial</i> |
| 70 | RICARDO AMILS PIBERNAT | Ecología Molecular de Ambientes Extremos
<i>Molecular Ecology of Extreme Environments</i> |
| 72 | JUAN ALFONSO AYALA SERRANO | División celular bacteriana y resistencia a antibióticos
<i>Bacterial cell division and antibiotics resistance</i> |
| 74 | JOSÉ BERENGUER CARLOS | Bioteología y genética de bacterias termófilas extremas
<i>Biotechnology and genetics of extreme thermophilic bacteria</i> |
| 76 | ESTEBAN DOMINGO SOLANS | Variabilidad genética de virus RNA
<i>Genetic variability of RNA viruses</i> |
| 78 | MARÍA FERNÁNDEZ LOBATO | Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar compuestos bioactivos
<i>Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds</i> |
| 80 | MAURICIO GARCÍA MATEU | Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología
<i>Virus Engineering and Nanobiotechnology</i> |



Virología y Microbiología

Virology and Microbiology

- 82 **PAULINO GÓMEZ-PUERTAS** Grupo de Modelado Molecular
Molecular Modelling Group
- 84 **WILFRIED J.J. MEIJER** Desarrollo de herramientas genéticas para la manipulación de bacterias Gram+ a partir de la caracterización molecular de un plásmido conjugativo de *Bacillus*
Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring the transfer and other functions of the conjugative Bacillus plasmid pLS20
- 86 **LUIS MENÉNDEZ ARIAS** Retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana y terapia antirretroviral
Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and antiretroviral therapy
- 88 **YOLANDA REVILLA NOVELLA** Mecanismos moleculares de interacción virus-célula: el modelo del virus de la peste porcina africana
Virus Cell Interaction. The ASFV Model
- 90 **FRANCISCO SOBRINO** 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
- 92 **IVÁN VENTOSO** Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos
mRNA structure and translational control in biological systems

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
(Hasta noviembre 2015)

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Soledad Blanco Chapinal
Leyre Mestre
Daniel Aguirre de Carcer
Bruno Hernáez
Alberto Rastrojo
Imma Montanuy

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Haleh Heidarieh
Graciela Alonso
Alberto Domingo López Muñoz

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Rocío Martín Hernández
Carolina Sánchez Fernández
María del Carmen Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Héctor Sánchez
Sandra Domínguez Manchoa
Carlos Fernández Linares

Científicos visitantes /
Visiting scientists:
Tania Hidalgo Crespo
(Institute Lavoisier CNRS, Paris, Francia)

Resumen de investigación

Estamos interesados en entender cómo los virus evaden la respuesta inmune del hospedador. Estamos caracterizando proteínas codificadas por herpesvirus y poxvirus que interaccionan con interferón, citoquinas o quimioquinas, y modulan su actividad. La glicoproteína G de los virus herpes simplex 1 y 2, patógenos humanos importantes, potencian la actividad de las quimioquinas modificando el tráfico intracelular de los receptores de quimioquinas del hospedador. También estamos caracterizando a nivel molecular proteínas de poxvirus que se secretan de la célula infectada y son capaces de unir e inhibir interferón, el factor necrosante de tumores o quimioquinas. La contribución de los receptores virales de citoquinas a la patogénesis se está estudiando en modelos murinos de infección. Entender mejor las actividades virales inmunomoduladoras, que se han optimizado durante millones de años de evolución virus-hospedador, nos ofrece información sobre la función de las citoquinas y nos ayuda a identificar nuevas estrategias terapéuticas para tratar enfermedades inflamatorias humanas.

Una segunda línea de investigación de nuestro grupo es el descubrimiento de nuevos virus en ecosistemas naturales. Los virus son las entidades biológicas mas abundantes y diversas de la Tierra pero la mayoría de los virus son desconocidos para el hombre. La metagenómica de virus nos ofrece la oportunidad de identificar comunidades complejas de virus presentes en ambientes naturales y está cambiando nuestra percepción del mundo de los virus. Utilizando metodologías de secuenciación de nueva generación hemos caracterizado a nivel genético, por primera vez, la comunidades complejas de virus en lagos la Antártida y el Ártico. Estos virus se han adaptado a las condiciones extremas de estos ambientes y son diferentes a los virus que se encuentran en otros ecosistemas naturales. Estamos extendiendo estos estudios a la identificación genética de microorganismos, incluidos los virus, presentes en el aire (airbiota), una información que es de relevancia para conocer la calidad del aire que respiramos y en salud humana.

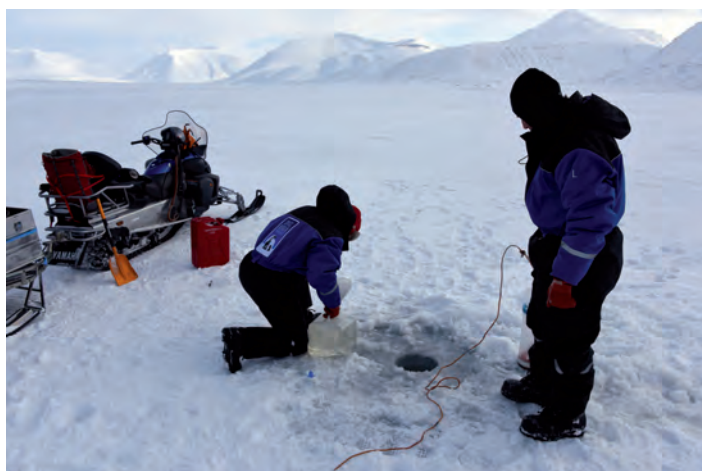


Figura 1. Muestreando lagos helados en las islas Svalbard (Noruega, 78° N) para estudiar la comunidad de virus en ecosistemas extremos del Ártico.

Figure 1. Sampling frozen lakes in Svalbard islands (Norway, 78° N) to study the viral community in the extreme ecosystems from the Arctic.

Research summary

We are interested in understanding how viruses evade the host immune response. We are characterizing herpesvirus and poxvirus proteins that interact with interferons, cytokines or chemokines, and modulate their activity. Glycoprotein G encoded by herpes simplex virus 1 and 2, important human pathogens, enhances the activity of chemokines by modifying intracellular trafficking of host chemokine receptors. Poxvirus proteins secreted from the cell that bind and inhibit interferon, tumour necrosis factor or chemokines are also being characterized at the molecular level. The contribution of viral cytokine receptors to pathogenesis is being addressed in mouse models of infection. Understanding viral immune modulatory activities, which have been optimized for millions of years of virus-host evolution, may provide insights into the function of cytokines and help us to identify new therapeutic approaches to treat human inflammatory diseases.

A second line of research from our group is the discovery of new viruses in natural ecosystems. Viruses are the most abundant and diverse biological entities on Earth but most viruses are unknown to man. Viral metagenomics is offering us the opportunity of identifying complex viral communities present in natural environments and is changing our perception of the virus world. Using next generation sequencing methodologies we have characterized at the genetic level, for the first time, complex viral communities from lakes in Antarctica and the Arctic. These viruses have been adapted to the extreme conditions of these environments and are distinct to viruses found in other natural ecosystems. We are expanding these studies to identify at the genetic level microorganisms, including viruses, present in the air (airbiota), which is of relevance to know the quality of the air we breath and for human health.

Publicaciones / Publications

- Cabrera, J. R., Viejo-Borbolla, A., Martínez-Martín, N., Blanco, S., Wandosell, F. and Alcamí, A. (2015). *PLoS Pathogens* **11**:e1004571.
- Martínez-Martín, N., Viejo-Borbolla, A., Martín, R., Blanco, S., Benovic, J. L., Thelen, M. and Alcamí, A. (2015). *Nature Communications* **6**:6163.
- Heidarieh, H., Hernaez, B. and Alcamí, A. (2015). *Virus Res.* **209**:67-75.
- Pontejo, S. M., Alejo, A. and Alcamí, A. (2015). *J. Biol. Chem.* **290**:15973-15984.
- Aguirre de Cárcer, D., López-Bueno, A., Pearce, D. and Alcamí, A. (2015). *Science Advances* **1**, e1400127.
- López-Bueno, A., Rastrojo, A., Peiró, R., Arenas, M. and Alcamí, A. (2015). *Molecular Ecology* **24**:4812-4825.
- Pontejo, S. M., Alejo, A. and Alcamí, A. (2015). *J. Gen. Virol.* **96**:3118-3123.
- Martín, V., Mavian, C., López-Bueno, A., Molina, A., Díaz, E., Andrés, G., Alcamí, A. and Alejo, A. (2015). *J. Virol.* **89**:10702-10706.
- Alcamí, A. (2016) Viral Anticytokine Strategies. In: Ratcliffe, M.J.H. (Editor in Chief) Encyclopedia of Immunobiology. *Academic Press, Oxford*. Vol. 2, pp. 597–604.
- Alcamí, A. (2016) Chemokines and Viral Infections. In: Ratcliffe, M.J.H. (Editor in Chief) Encyclopedia of Immunobiology. *Academic Press, Oxford*. Vol. 4, pp. 270–278.
- Velázquez, D., López-Bueno, A., Aguirre de Cárcer, D., de los Ríos, A., Alcamí, A. and Quesada, A. (2016). *Scientific Reports* **6**:22954.
- Aguirre de Cárcer, D., Pedrós-Alió, C., Pearce, D. and Alcamí, A. (2016). *FEMS Frontiers in Microbiology*. **92**:fiw074.
- Aguirre de Cárcer, D., Pedrós-Alió, C., Pearce, D. and Alcamí, A. (2016). *Frontiers in Microbiology* **7**:337.
- López-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A. M., Castro, D., Borrego, J. J., Alcamí, A. and Alejo, A. (2016). *J. Virol.* **90**:8768-8779.
- Cabrera, J. R., Viejo-Borbolla, A., Alcamí, A. and Wandosell, F. (2016). *J. Neuroinflammation* **13**:210.
- Rastrojo, A. and Alcamí, A. (2016). *Virus Res.* pii: S0168-1702(16)30499-3.
- Núñez, A., Amo de Paz, G., Rastrojo, A., García, A. M., Alcamí, A., Gutiérrez-Bustillo, A. M. and Moreno, D. A. (2016). *Int. Microbiol.* **19**:1-13.
- Núñez, A., Amo de Paz, G., Rastrojo, A., García, A. M., Alcamí, A., Gutiérrez-Bustillo, A. M. and Moreno, D. A. 2016. *Int. Microbiol.* **19**:69-80.
- Boroto, A., Reyes-Garau, D., Jiménez, M. A., Carrasco, E., Moreno, B., Martínez-Pasamar, S., Cortés, J. R., Perona, A., Abia, D., Blanco, S., Fuentes, M., Arellano, I., Lobo, J., Heidarieh, H., Rueda, J., Esteve, P., Cibrián, D., Martínez-Riaño, A., Mendoza, P., Prieto, C., Calleja, E., Oeste, C. L., Orfao, A., Fresno, M., Sánchez-Madrid, F., Alcamí, A., Bovolenta, P., Martín, P., Villoslada, P., Morreale, A., Messegue, A. and Alarcon, B. (2016). *Science Translational Medicine* **8**:370ra184.
- Martínez-Martín, N., Viejo-Borbolla, A. and Alcamí, A. (2016). *J. Gen. Virol.* **97**:3007-3016.

Otras actividades / Other activities

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/).

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

Gestor del Programa de Biomedicina del Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Economía y Competitividad / Chairman of the Biomedicine Programme from Plan Nacional I+D+i, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Haleh Heidarieh (Dic 2015). El papel de las quimioquinas en infecciones virales. Universidad Autónoma de Madrid. Diciembre 2015. Director: Antonio Alcamí.

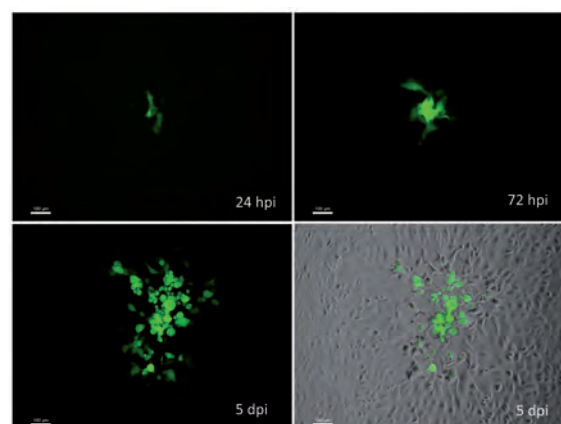


Figura 2. Microscopía de fluorescencia mostrando la formación de una placa de lisis en células en cultivo de un virus ectromelia recombinante que expresa GFP.

Figure 2. Fluorescence microscopy showing the formation of a lysis plaque in cell culture of a recombinant ectromelia virus expressing GFP.

Evolución, patogenia y potencial anti-cancer de los virus ssDNA

ssDNA virus evolution, pathogenesis, and anti-cancer potencial



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

Personal Científico /
Scientific Staff:
Alberto López-Bueno

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Nooshin Bayat
Marcos Parras Moltó
Carlos Gallego García

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Josefa González-Nicolás

Estudiantes /
Students:
Rebeca Lavega González

Resumen de investigación

El laboratorio investiga la biología de los virus de genoma ssDNA para entender las bases moleculares de (i) su evolución y exitosa presencia en los tres dominios de la vida, (ii) los mecanismos por los cuales causan enfermedades y persisten en sus hospedadores, y (iii) su interacción con células de cáncer humano, lo que en algunos casos les confiere potencial oncolítico. En estudios recientes, hemos analizado el tropismo privilegiado de los virus miembros de la familia *Parvoviridae* por tejidos proliferativos y células cancerosas, cuyas bases moleculares son aún inciertas. Hemos demostrado que el ciclo vital del parvovirus MVM se vincula de una forma exquisita con el de la célula hospedadora, y avanza en sus etapas principales - transcripción, expresión, transporte de proteínas, ensamblaje de cápsidas y maduración de los viriones - de forma acompasada a la progresión por las fases G1-S-G2 del ciclo celular (Figura 1A). Cuando se bloquea la progresión del ciclo celular en células previamente infectadas, se provoca una acumulación citoplasmática equivocada de las cápsidas, lo que impide la maduración del virus y resulta en una infección abortiva (Figura 1B). La estricta regulación ejercida por el ciclo celular sobre el transporte hacia el núcleo de las proteínas que forman la cápsida del MVM es un proceso clave del tropismo de los parvovirus hacia células proliferativas y tumorales, lo que podría contribuir a fundamentar una utilización mas extensa de estos virus en terapias biológicas anti-cáncer.

En otros estudios, Alberto López-Bueno lidera un proyecto independiente que tiene como objetivo principal caracterizar la comunidad de virus de la cavidad oral humana y entender mejor como los bacteriófagos manipulan nuestros ecosistemas microbianos. Mediante el uso de diversas técnicas de secuenciación masiva y análisis bioinformático, se están estudiando unos 40 viomas procedentes de placa supragingival y mucosa oral de personas afectadas por caries y estomatitis aftosa recurrente. Aprovechando la enorme sensibilidad de estas técnicas se están descubriendo nuevos virus humanos y de animales (Figura 2).

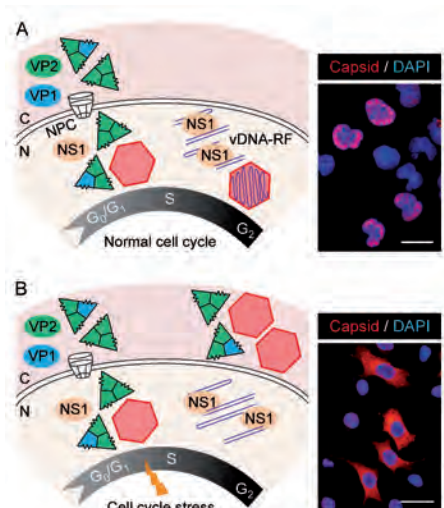


Figura 1. Acoplamiento temporal y funcional del ciclo vital del parvovirus MVM con el ciclo celular. (A) Etapas sin restricciones de ciclo celular. Derecha: Cápsidas de virus ensambladas (rojo) dentro del núcleo (azul) (B) Células sometidas a stress del ciclo celular mostrando un ensamblaje erróneo de las cápsidas en el citoplasma con exclusión nuclear.

Figure 1. Temporal and functional adjustment of the parvovirus MVM and the cell cycles. (A) Stages with no cell cycle restrictions. Right: Assembled virus capsids (red) inside the nucleus (blue) (B) Cells under stress of the cell cycle showing an incorrect assembly of the capsids in the cytoplasm with nuclear exclusion. C: cytoplasm; N: nucleus; NPC: nuclear pore complex; NS1, non-structural viral protein 1; VP1, VP2, structural proteins. VDNA-RF, replicative intermediates of the virus genome.

Research summary

The laboratory investigates the biology of ssDNA genome viruses to understand the molecular basis of (i) their evolution and successful presence in all three domains of life, (ii) the mechanisms by which they cause disease and persist in their hosts, and (iii) the privileged interaction with human cancer cells, which in some cases confer oncolytic potential. In recent studies, we have analyzed the tropism of virus members of the Parvoviridae family to proliferative tissues and cancer cells, whose molecular bases are still uncertain. We have shown that the life cycle of the parvovirus MVM is tightly coupled with that of the cell and progresses in its main stages - transcription, expression, protein transport, capsid assembly and virus maturation - closely to the progression through the G1-S-G2 phases of the cell cycle (Figure 1A). When cell cycle progression is blocked in previously infected cells, an incorrect cytoplasmic accumulation of the capsids is provoked, which prevents virus maturation and results in an abortive infection (Figure 1B). The strict regulation exerted by the cell cycle on the transport to the nucleus of the proteins that form the MVM capsid is a key process of the tropism of the parvovirus towards proliferative and tumor cells, which could contribute to support a more extensive use of these viruses in anti-cancer biological therapies.

In other studies, Alberto López-Bueno undertakes an independent project to characterize through metagenomics the viral assemblage of the human oral cavity. He is specially interested in understanding how bacteriophages manipulate our oral microbiome. By using a range of next generation sequencing technologies (NGS) and bioinformatics pipelines, he is exploring more than 40 viromes of supragingival plaque and mucosa from people affected by caries and recurrent aphthous stomatitis, respectively. Taking advantage of the high sensitivity of NGS technologies new human and animal viruses are being discovered (Figure 2).

Publicaciones / Publications

Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Riobos, L., Domínguez, C., Kann, M., and José M. Almendral. (2015). The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. *PlosPathogens*, 11:e1004920.

López-Bueno A, Mavian C, Labella AM, Castro D, Borrego JJ, Alcamí A, and Alejo A. (2016) Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *J Virol*. 90:8768-79.

Martín V, Mavian C, López Bueno A, de Molina A, Díaz E, Andrés G, Alcamí A, and Alejo A. (2015). Establishment of a Zebrafish Infection Model for the Study of Wild-Type and Recombinant European Sheatfish Virus. *J Virol*. 89:10702-6.

Stöhr AC, López-Bueno A, Blahak S, Caeiro MF, Rosa GM, Alves de Matos AP, Martel A, Alejo A, and Marschang RE (2015). Phylogeny and differentiation of reptilian and amphibian ranaviruses detected in Europe. *PLoS One*. 10:e0118633.

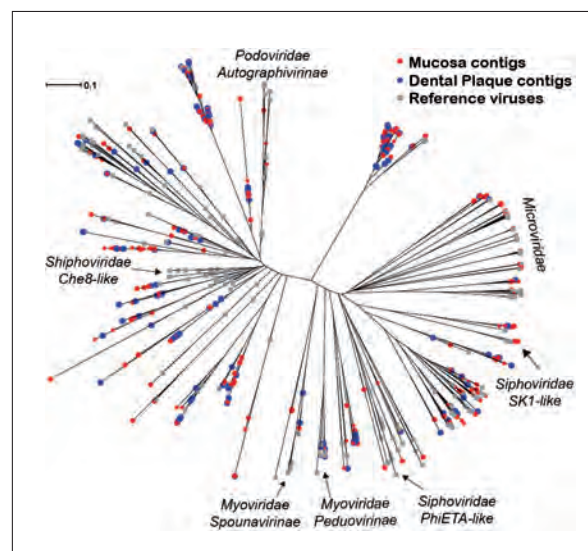


Figura 2. Comparación de genomas de nuevos virus ensamblados desde viromas de la cavidad oral humana. 426 genomas casi completos ensamblados en este estudio junto con 200 genomas virales de referencia fueron comparados en parejas mediante tBLASTx. Utilizamos una estrategia de agrupación basada en la similitud entre proteomas para construir este árbol mediante Neighbour Joining.

Figure 2. Genomic comparison of novel viruses assembled from human oral cavity. 426 nearly full-length genomes assembled in this study together with 200 reference viruses were pairwise-compared by tBLASTx. The Neighbour Joining tree was achieved by a clustering strategy based on proteomic similarity.

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
(Hasta 31 diciembre 2015)

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Moustafa Malki
Monika Oggerin de Orube

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
Diego Carrillo
(Hasta 31 marzo 2016)

Científicos Visitantes / Visiting Scientists
Linda Amaral
(MBL, Woods Hole, USA)
Eric Zettler
(MBL, Woods Hole, USA)

Resumen de investigación

La investigación desarrollada en nuestro grupo 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 Antártida (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, biomineralización y fitorremediación) de ambientes ácidos extremos (la cuenca del Río Tinto, distintas lagunas ácidas de la Faja Pirítica Ibérica y la Antártida).
- Recientemente se ha iniciado en colaboración con el grupo de Felipe Gómez del Centro de Astrobiología el estudio de la ecología microbiana de la depresión de Danakil (Etiopía), un ecosistema con un pH extremadamente ácido (pH cero) y una elevada concentración de hierro.



Figura 1. Vista del volcán freático de Dallol (depresión del Danakil, Etiopía).

Figure 1. View of the freatic volcano of Dallol (Danakil depression, Ethiopia).

Research summary

This area of research has the following objectives:

- *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 Antarctica (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, biomineralization and phytoremediation) of extreme acidic environments (Río Tinto basin, different acidic lakes of the Iberian Pyritic Belt, Antarctica),*
- *Recently we started a collaboration with the group of F. Gómez from the Centro de Astrobiología to characterize the microbial ecology of the Danakil depression (Ethiopia), an extremely acidic ecosystem (pH zero) with high concentration of iron.*

Publicaciones / Publications

Amils, R. (2015) Technological challenges to understanding the microbial ecology of deep subsurface ecosystems. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 9-10.

Fernández-Remolar, D., Santamaría, J., Amils, R., Parro, V., Gómez-Ortiz, D., Izawa, M.R.M., Pérez-Rodríguez, R., Rodríguez, N., López-Martínez, N. (2015) Formation of iron-rich metazoan-like bivalve structure (IRBS) by microbial communities. *Biogeoscience*, **120**: 147-168, doi: 10.1002/2014JG002745.

de la Fuente, V., Sánchez-Mata, D., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils R. (2015) A study of *Sarcocornia* A.J. Scott (Chenopodiaceae) from Western Mediterranean Europe. *Annals of Botany*, **117**: 343-352,

Javani, S., Marín, I., Amils, R., Abad, J.P. (2015) Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **483**:60-69.

Sánchez-Román, M., Puente-Sánchez, F., Parro, V., Amils, R. (2015) Nucleation of Fe-rich phosphates and carbonates on microbial cells and exopolymeric substances. *Frontiers*.

Oggerin, M., Escudero, C., del Moral, C., Rodríguez, N., Amils, R. (2015) High copper tolerant *P. lilacinum* strain isolated from a rich environment in chalcocopyrite, Río Tinto (SW, Spain). *Adv. Materials Research*, **1130**: 157-160.

Cayol, J.L., Ollivier, B., Alazard, D., Amils, R., Godfroy, A., Piette, F., Orieur, D. (2015) The extreme conditions of life on the planet and Exobiology. In Bertrand, J.L., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., Sime-Ngando, T. (eds.) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer Science + Business Media, Dordrecht, pp. 353-394.

Amils, R. (2015) Geomicrobiology of Río Tinto, a model of interest in biohydrometallurgy. *Adv. Materials Research*, **130**: 83-86.

Díaz-Maldonado, H., Gómez, M.J., Moreno-Paz, M., San Martín-Uriz, P., Amils, R., Parro, V., López de Saro, F.J. (2015) Transposase interactions with the β sliding clamp: effects on insertion sequence proliferation and transposition rate. *Scientific Reports*, **5**: 13329.

Puente-Sánchez, F., Olsson, S., Gómez-Rodríguez, M., Souza-Egipsy, V., Altamirano-Jeschke, M., Amils, R., Parro, V., Aguilera, A. (2016) Solar Radiation Stress in natural acidophilic biofilms of *Euglena mutabilis* revealed by metatranscriptomics and PAM fluorimetry. *Protists*, **167**: 67-81.

Oggerin, M., Tornos, F., Rodríguez, N., Amils, R. (2016) Fungal iron biomineralization in Río Tinto. *Minerals* **6**, 37.

Amils, R., Fernández-Remolar, D. (2016) Acidophiles and Astrobiology. In Johnson, B., Quatrini, R. (eds), *Acidophiles, life in extremely acidic conditions*. Caister Academic Press, UK, pp 285-300.

Kaplan, H.H., Milliken, R.E., Fernández-Remolar, D., Amils, R., Robertson, K., Knoll, A.H. (2016) Orbital evidence for clay and acidic sulfate assemblages on Mars and mineralogical analogs from Río Tinto, Spain. *J. Geol. Res.*, **275**: 45-64.

Amils, R. (2016) Lessons learned from thirty years of geomicrobiological studies of Río Tinto. *Res Microbiol.* **167**: 539-545.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Patxi San Martín (2015). Isolation and characterization of *Acidiphilium* sp. PM, a nickel-resistant electricigen from Río Tinto. Universidad Autónoma de Madrid. Ricardo Amils

División celular bacteriana y resistencia a antibióticos

Bacterial cell division and antibiotics resistance



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

Personal Científico /
Scientific Staff:
Graciela Pucciarelli

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Emina Saad
(01/10/2015 15/11/2015)
Ines Taieb
(01/10/2015 15/11/2015)

Científicos visitantes /
Visiting Scientist:

Zayda Lorena Corredor Rozo
(U. El Bosque, Bogotá, Colombia)
(27/01/2016 20/03/2016)

Gabriel Torrens Ribot
(H. Son Espases, Mallorca)
(28/01/2016 27/04/2016)

Gustavo Varela Pensado
(U. La Republica, Uruguay)
(09/05/2016 26/05/2016)

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, transglicosilasas, 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 han conducido al descubrimiento de nuevas vías en el metabolismo de la pared celular, proporcionando una visión más real de la diversidad de peptidoglicano en la naturaleza y de su funcionalidad. 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 orientado para promover un serio esfuerzo interdisciplinario incluyendo áreas tan diversas como microbiología, cristalografía, metabolómica y bio-informática.

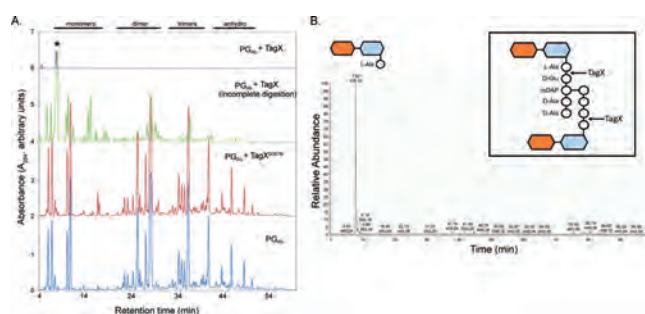


Figura 1. TagX es una L,D-endopeptidasa.

(A) Análisis cromatográfico por HPLC de peptidoglicano (PG_{Ab}) aislado *A. baumannii*. PG_{Ab} se digirió con TagX, se digirió incompletamente con TagX, se digirió con $TagX^{D287N}$, o se dejó sin adición enzimática. Después del tratamiento, el PG_{Ab} se digirió posteriormente con muramidasa y los muropeptidos resultantes se analizaron por HPLC. En la parte superior se indican picos correspondientes a monómeros, dímeros, trímeros y anhidromuropeptidos. El asterisco indica el pico en la muestra de PG_{Ab} digerida con TagX que se seleccionó adicionalmente para la caracterización de MS. (B) MS análisis del pico seleccionado del patrón de HPLC. El pico principal a m/z 570 corresponde a un monómero de PG_{Ab} que contiene L-alanina. La inserción muestra el sitio de escisión por TagX propuesto en un dímero de PG. mDAP, ácido meso-diaminopimélico.

Figure 1. TagX is an L,D-endopeptidase.

(A) Chromatographic analysis by HPLC of isolated *A. baumannii* PG (PG_{Ab}). PG was digested with TagX, incompletely digested with TagX, digested with $TagX^{D287N}$, or left without enzyme addition. After treatment, the PG was subsequently digested with muramidase and the resulting muropeptides were analyzed by HPLC. Peaks corresponding to PG monomers, dimers, trimers, and anhydromuropeptides are indicated at the top. The asterisk indicates the peak in the TagX-digested PG_{Ab} sample that was further selected for MS characterization. (B) MS analysis of the peak selected from the HPLC trace. The major peak at m/z 570 corresponds to a PG monomer containing L-alanine. The inset shows the proposed TagX cleavage site on a PG dimer. mDAP, meso-diaminopimelic acid.

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 have 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 has been made on the research of low molecular weight PBPs and inducible beta-lactamase systems as sensors of cell wall damage. The results have lead to the discovery of new pathways in the cell wall metabolism, which should provide a closer to real vision of peptidoglycan diversity and functionality in nature. The results from these studies are been of substantial help to better understand fundamental questions about bacterial social behavior in poly-microbial communities and adaptability against environmental challenges. This project relies significantly in collaborative relations with an important number of domestic and foreign laboratories, and is planned to promote a serious inter disciplinary effort including expertise areas as diverse as microbiology, crystallography, metabolomics and bio-informatics.

Publicaciones / Publications

Aguilera Rossi, C.G., Gómez-Puertas, P. and J. A. Ayala Serrano. (2016) *In vivo* functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa* *BMC Microbiology* **16**:234.

Weber BS, Hennon SW, Wright MS, Scott NE, de Berardinis V, Foster LJ, Ayala JA, Adams MD, Feldman MF. (2016) Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* and Identification of a Novel Peptidoglycan Hydrolase, TagX, Required for Its Biogenesis. *MBio*. **7**. pii: e01253-16.

Studer P, Borisova M, Schneider A, Ayala JA, Mayer C, Schuppler M, Loessner MJ, Briers Y. (2016) The Absence of a Mature Cell Wall Sacculus in Stable *Listeria monocytogenes* L-Form Cells Is Independent of Peptidoglycan Synthesis. *PLoS One*. **11**:e0154925.

Ropy A. and Ayala J.A. (2015) The effect on peptidoglycan composition of uncharacterized *Pae*-AmpC mutants probes its functionality as DD-peptidase. *International Journal of Microbiology Research*. **7**:710-716.

Ropy A., G. Cabot, I. Sánchez-Diener, C. Aguilera, B. Moya, J.A. Ayala and A. Oliver. (2015) Role of *Pseudomonas aeruginosa* Low Molecular Mass Penicillin-Binding Proteins in AmpC Expression, β -lactam Resistance and Peptidoglycan Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **59**:3925-34.

M. Bernal-Cabas, J. A. Ayala, and T. Raivio. (2015) The Cpx envelope stress response modifies peptidoglycan cross-linking via the L,D-transpeptidase LdtD and the novel protein YgaU. *Journal of Bacteriology*. **197**:603-614.

Cambré A, Zimmerman M, Sauer U, Vivijis B, Cenens W, Michiels CW, Aertsen A, Loessner MJ, Noben JP, Ayala JA, Lavigne R, Briers Y. (2015) Metabolite profiling and peptidoglycan analysis of transient cell wall-deficient bacteria in a new *Escherichia coli* model system. *Environ Microbiol*. **17**:1586-99.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Aguilera Rossi, C. G. (2015). "Caracterización funcional y estructural de LMM-PBP4 y análisis de su papel modulador en la integridad molecular del peptidoglicano para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*". Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias. Sobresaliente cum laude.

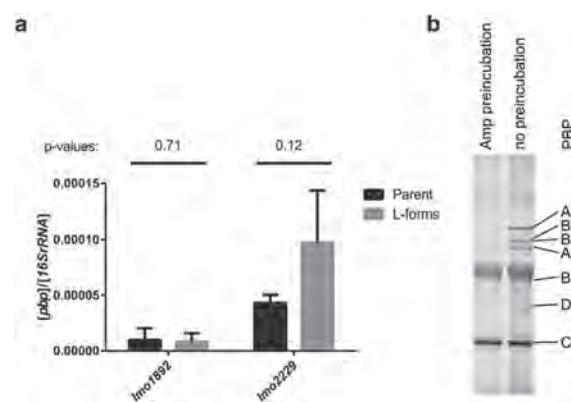


Figura 2. Las formas L de *L. monocytogenes* expresan ambas PBP bifuncionales. (A) Los niveles de transcripción de *lmo1892* (que codifica PBPA1) y *lmo2229* (que codifica PBPA2) no son significativamente diferentes en células parentales y en forma de L como se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se representan las medias y las desviaciones estándar de tres repeticiones biológicas ($n = 3$), así como los test pareadas y los correspondientes valores P. (B) La incubación de extractos celulares totales de formas L de *L. monocytogenes* con BOCILLIN FL fluorescente revela la presencia de las dos PBP bifuncionales, PBPA1 y PBPA2, y las transpeptidasas PBPB1, PBPB2 y PBPB3. Además, se detectaron PBPC2, que contenía un dominio de clase C de β -lactamasa, y PBPD1, que contenía un dominio DD-carboxipeptidasa. Las muestras preincubadas con altas concentraciones de ampicilina sirven como control de especificidad de la unión de BOCILLIN FL. PBPC2 y PBPB3 ya se había reportado su baja competición por la ampicilina.

Figure 2. L-forms *L. monocytogenes* express both bifunctional PBPs. (a) Transcription levels of *lmo1892* (encoding PBPA1) and *lmo2229* (encoding PBPA2) are not significantly different in parental and L-form cells as determined by quantitative real-time PCR. Means and standard deviations of three biological replicates ($n = 3$), as well as pairwise t-tests and the corresponding P-values are depicted. (b) Incubation of total cell extracts of L-form *L. monocytogenes* with fluorescent BOCILLIN FL reveals the presence of the two bifunctional PBPs, PBPA1 and PBPA2, and the transpeptidases PBPB1, PBPB2 and PBPB3. In addition, PBPC2, containing a β -lactamase class C domain, and PBPD1, containing a DD-carboxypeptidase domain, were detected. Samples preincubated with high concentrations of ampicillin serve as specificity control of BOCILLIN FL binding. PBP C2 and B3 were already reported to be poorly competed by ampicillin.

Biotechnología 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
Mario Mencía Caballero

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*
Ana Luisa Lopes Ribeiro
Nieves García Quintans
Marcos Almendros Giménez
Alba Blesa Esteban

Becarios Predoctorales / *Graduate Students:*
Mercedes Sánchez Costa
Ignacio Baquedano Mozos
Sandra Bosch Reñé

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance:*
Esther Sánchez Freire
María Luisa del Pozo Polo

Beatriz Praena García
Blanca Martín de Juan

Técnicos de Gestión / *Project Manager:*
Astrid Valencia Quiñones
Sara González Rodríguez

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Diego Llamazares de Miguel
Jorge Bravo Villanueva
Marta Failde Soler

Científicos Visitantes / *Visiting Scientists:*
Francesca Anna Fusco

Resumen de investigación

En el grupo estudiamos aspectos básicos y aplicados con bacterias termófilas como modelos y fuentes de bioherramientas. Nuestro modelo es *Thermus thermophilus* (Tth) debido a su rápido crecimiento y eficiente sistema de transformación.

En aspectos básicos, hemos estudiado un nuevo sistema de transferencia horizontal de genes (HGT) denominado *transjugación*, dado que implica sistemas de expulsión de DNA del donador y de captación de éste por el receptor. Hemos identificado y estudiado una DNA translocasa requerida en el proceso de expulsión. También hemos estudiado el papel de la interferencia DNA-DNA mediada por la proteína Argonauta como barrera frente a la HGT, demostrando que ésta se activa en función de la vía de entrada, y no por la naturaleza del DNA. En realidad, TthAgo permite distinguir el DNA medioambiental potencialmente peligroso del DNA fiable transferido desde otra bacteria. Nuestros esfuerzos se dirigen en estos momentos a profundizar en estos mecanismos de HGT y defensa.

En nuestro trabajo aplicado, hemos desarrollado nuevas herramientas para la selección *in vivo* de variantes termoestables de proteínas mediante interferencia de plegamiento: sólo los mutantes termoestables pliegan correctamente en Tth, permitiendo el plegamiento de la proteína testigo fusionada a él, y confiriendo una propiedad seleccionable. En los últimos dos años nos hemos implicado en proyectos de la UE para la mejora del mismo principio y su aplicación *in vitro* en microgotas de agua en aceite de picolitros de volumen, empleando dispositivos de microfluídica para ello.

En los próximos años estudiaremos los mecanismos de activación y desactivación de TthAgo implicados en la respuesta de interferencia, así como en descifrar en detalle los mecanismos de transjugación. Por otra parte, pretendemos perfeccionar nuestra plataforma de cribado para la selección de variantes termoestables y de proteínas naturales a partir de metagenomas.

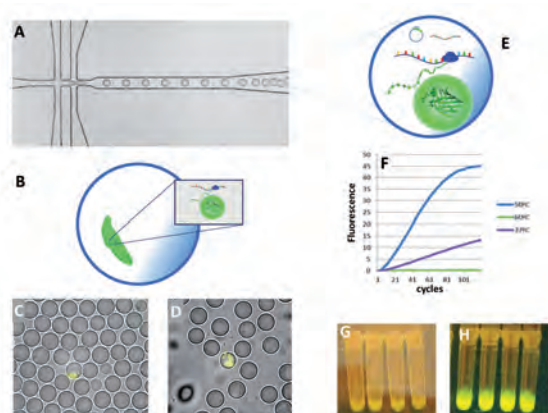


Figura 1. Cribado de alta eficiencia basado en microgotas. La figura muestra un dispositivo de microfluídica para la generación a alta velocidad de microgotas de tamaño uniforme y volumen de picolitros (A). Tales microgotas se pueden emplear para la encapsulación de células de *Thermus thermophilus* que expresan una proteína fluorescente termoestable (B). Tras la incubación a 70°C estas células forman microcolonias dentro de las microgotas (C, D) que pueden ser sometidas a ensayos específicos. Los sistemas de transcripción-traducción *in vitro* pueden ser también encapsulados (E), y la producción de una proteína fluorescente termoestable puede ser empleada como marcador para detectar su actividad a diferentes temperaturas (F). Los paneles G y H corresponden a imágenes de muestras positivas y negativas en la producción de sGFP *in vitro* a 50°C.

Figure 1. Microdroplet-based highthroughput screening. Figure shows a silicone microfluidic device for the high-speed generation of monodisperse water-in-oil microdroplets of picoliter volumes (A). Such droplets can be used to encapsulate individual cells of *Thermus thermophilus* expressing a fluorescent thermostable protein (B). Upon incubation at 70°C these cells form microcolonies inside the droplets (C, D) that can be interrogated for a specific property. *In vitro* transcription-translation systems can be also encapsulated (E), and the production of a thermostable fluorescent protein allows to follow their activity at different temperatures (F). Panels G and H are images of the IVTT system working on negative and sGFP positive samples synthesized at 50°C.

Research summary

Our group carries out both basic and applied research using laboratory-adapted thermophiles as models and as source of biotools. Our main model is *Thermus thermophilus* (Tth) because of its fast growth under lab-controlled conditions and its highly efficient natural competence.

In basic research, we have focussed into deciphering a new type of horizontal gene transfer (HGT) mechanism in Tth baptized “transjugation” because it involves DNA-pushing in the donor and DNA-pulling in the recipient, respectively. In this context, we have identified a DNA translocase required for the pushing step. We have also analysed the role of the DNA-DNA interference mechanism mediated by the Argonaute protein as barrier for HGT, and shown that it depends on the way in which the DNA enters the cell, and not on its nature. Actually, the TthAgo protein allows to distinguish between potentially dangerous environmental DNA from “trustworthy” DNA obtained from a related strain. We are now deepening our understanding the HGT transfer and defense mechanisms at basic and applied levels.

In our applied research, we have developed new tools for in vivo selection of thermostable variants of proteins through folding interference: only those variants thermostable enough fold properly at the temperatures of Tth growth, allowing the proper folding of a reporter protein fused to its C-terminus and thus conferring a selectable property. In recent times, we have been involved in EU projects that further develop and apply this same principle in vivo and in vitro (IVTT) in picoliter water-in-oil microdroplets within microfluidic devices.

In the next years we will investigate the components and mechanisms of activation / deactivation of thAgo involved in the interference response and in deciphering in greater detail the transjugation mechanism. On the other hand, we will further develop our ultrahigh-throughput screening platform for the selection of protein variants and enzymes from metagenomes.

Publicaciones / Publications

Blesa A., Berenguer, J. (2015) Contribution of vesicle protected extracellular DNA to horizontal gene transfer in *Thermus* spp. *Int. Microbiol.* **18**, 177-187.

Blesa, A.; Cesar, CE; Averhoff, B; Berenguer, J. (2015) Noncanonical Cell-to-Cell DNA Transfer in *Thermus* spp. Is Insensitive to Argonaute-Mediated Interference. *J. Bacteriol.* **197**(1): 138-146

Velasco-Lozano, S., Rocha-Martin, J., Favela-Torres, E., Calvo, J., Berenguer, J., Guisán, J.M., López-Gallego, F. (2016) Hydrolysis and oxidation of racemic esters into prochiral ketones catalyzed by a consortium of immobilized enzymes. *Biochem Eng J.* **112**, 36-142

Vettone, A., Serpe, M., Hidalgo, A., Berenguer, J., del Monaco, G., Valenti, A., Rossi, M., Ciaramella, M., Perugini, G. A. (2016) Novel thermostable protein-tag: optimization of the *Sulfolobus solfataricus* DNA-alkyl-transferase by protein engineering. *Extremophiles.* **20** (1):1-13.

Blesa A., Berenguer, J. (2016) Transformation of *Thermus* species by natural competence. *Bioprotocol*, **6** (22).

Blesa A., Berenguer, J. (2016) Cell-to-cell DNA transfer among *Thermus* species. *Bioprotocol*, **6** (22).

Otras actividades / Other activities

Coordinación del proyecto europeo METAFLUIDICS (2016-2020): Dr. Aurelio Hidalgo.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alba Blesa Esteban (2016). Horizontal gene transfer in *Thermus thermophilus*: mechanisms and barriers. Universidad Autónoma de Madrid. Mención internacional. Director: José Berenguer Carlos.

Variabilidad genética de virus RNA

Genetic variability of RNA viruses



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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Celia Perales Viejo

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ignacio de la Higuera Hernández
(Hasta enero 2016)
Elena Moreno del Olmo
Victoria Castro Illana

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Ana Isabel de Ávila Lucas
Isabel Gallego Jiménez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Irene Sánchez Martín
Josselyn Peña
Mohamad T. Dandan
Alfonso Gómez González
Inés Palacio Blanco

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Mónica García Álvarez
(Centro Nacional de
Microbiología, ISCIII)

Resumen de investigación

Hemos trabajado en el desarrollo de nuevas estrategias antivirales basadas en mutagénesis letal que eviten la selección de mutantes víricos que escapan a los tratamientos. El trabajo ha tenido una vertiente experimental con el virus de la hepatitis C (VHC) humano, virus de la fiebre aftosa (VFA) animal y también una vertiente teórica sobre nuevas implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies. Con el VHC hemos documentado que el alto fitness del virus puede ser un factor de resistencia parcial al inhibidor de la polimerasa sofosbuvir. En la búsqueda de nuevos agentes mutagénicos aceptados para uso en humanos hemos demostrado que el antiviral de amplio espectro favipiravir es mutagénico para VHC. El sistema de replicación de VHC en cultivos celulares nos ha permitido colaborar en estudios de interacción virus-hospedador con otros grupos. Respecto al VFA, hemos identificado residuos de la polimerasa vírica que influyen en el reconocimiento de análogos de nucleótido mutagénicos; este conocimiento puede influir en el diseño de combinaciones antivirales más efectivas. Hemos descrito un mecanismo de escape a mutagénesis letal independiente de la polimerasa, asociado a un solo cambio de aminoácido en la proteína no estructural 2C de VFA. Hemos incorporado a nuestros estudios medidas de diversidad viral basadas en secuenciación masiva y hemos participado en el diseño de microarrays para detección de variantes minoritarias en poblaciones de virus.

A nivel teórico, hemos recopilado nuevas implicaciones de cuasiespecies desveladas por estudios en varios laboratorios y en el nuestro, con publicación de dos libros y varios artículos. En uno de ellos se propone una distinción entre la recombinación inevitable mecanísticamente y aquella relevante biológicamente que señala puntos importantes de transición durante una evolución que es predominantemente clonal (ver figura). Nuestros esfuerzos se centran en convertir el bagaje teórico en aplicaciones para combatir las enfermedades víricas.

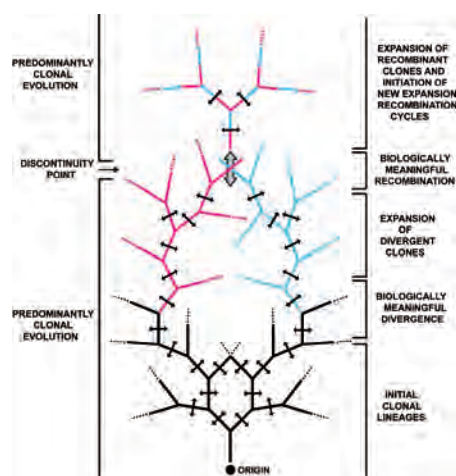


Figura 1. Esquema ilustrativo de la evolución clonal de virus. Aunque la recombinación es permanente (dobles flechas perpendiculares a cada línea evolutiva), la recombinación biológicamente significativa sólo ocurre cuando ha habido una diversificación previa (líneas evolutivas rojas y azules). Ello marca un punto de discontinuidad (doble flecha ancha vertical). Bordeando la figura se indican acontecimientos evolutivos. El esquema no implica ninguna escala de espacio o tiempo. Tanto se puede referir a la evolución dentro de un individuo infectado como a largo plazo a nivel epidemiológico. (Figura reproducida de Perales et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (29): 8878-8892, 2015, con permiso).

Figure 1. Clonal viral evolution. Despite recombination being permanent (double arrows perpendicular to each evolutionary line), biologically meaningful recombination occurs only following lineage diversification (blue and red lines). This marks discontinuity points (broad, vertical double arrow). Around the figure, important evolutionary events are indicated. The scheme can apply either to intra-host evolution or long-term inter-host evolution, at the epidemiological level. (Reproduced from Perales et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (29): 8878-8892, 2015, with permission).

Research summary

We have worked in the development of new antiviral strategies based on lethal mutagenesis to avoid selection of treatment-escape viral mutants. The work has had an experimental part with hepatitis C virus (HCV) and foot-and-mouth disease virus (FMDV), as well as a theoretical line on new biological implications of quasispecies dynamics. With HCV we have documented that high viral fitness can confer partial resistance to the polymerase inhibitor sofosbuvir. In a search for new mutagenic agents licensed for administration to humans, we have shown that the broad-spectrum antiviral agent sofosbuvir is mutagenic for HCV. The cell culture system for HCV has allowed us several collaborations with other groups on virus-cell interactions. Regarding FMDV, we have identified polymerase residues that affect nucleotide analogue recognition; this knowledge may permit the design of more effective antiviral combinations. We have described a lethal mutagenesis-escape mechanism which is polymerase-independent and is associated with a single amino acid substitution in non-structural viral protein 2C. We have adopted for our studies measurements of diversity derived from deep sequencing and have participated in the design of microarrays to detect minority variants in viral populations.

Regarding theoretical studies, we have compiled quasispecies implications revealed by others and us, with publication of two books and several articles. In one of them we propose a distinction between recombination which is mechanistically unavoidable and biologically relevant recombination that signals important transition points in an evolution which is essentially clonal (see figure). Our efforts are directed towards converting a theoretical body of quasispecies understanding into applications to combat viral diseases.

Publicaciones / Publications

Quer, J., Gregori, J., Rodríguez-Frías, F., Buti, M., Madejon, A., et al. (2015) High-resolution Hepatitis C virus (HCV) subtyping, using massive sequencing and phylogeny, optimal alternative to current methods. *J.Clin. Microb.* **53**:219-226.

Andino, R. and Domingo, E. (2015) Viral quasispecies. *Virology*, 479-480: 46-51.

Perales, C. Moreno, E. Domingo, E. (2015) Clonality and intracellular polyploidy in virus evolution and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **112**:8887-92.

Ferrer-Orta, C., de la Higuera, I., Caridi, F., Sanchez-Aparicio, M.T., Moreno, E. Perales, C., Singh, K., Sarafianos, S.G., Sobrino, F. Domingo, E., Verdaguier, N. (2015) Multifunctionality of a picornavirus polymerase domain: nuclear localization signal and nucleotide recognition. *J. Virol.*, **89**:6848-6859.

Madejón, A., Sheldon, J., Francisco-Recuero, I., Perales, C., Dominguez-Beato, M., Lasa, M., Sanchez-Perez, I., Muntané, J., Domingo, E., Garcia-Samaniego, J., Sanchez-Pacheco, A. (2015) Hepatitis C virus-mediated Aurora B kinase inhibition modulates inflammatory pathway and viral infectivity. *Journal of Hepatology*, **63**:312-9.

Perez-del-Pulgar, S., Gregori, J., Rodríguez-Frías, F., Gonzalez, P., García-Cehic, D., Ramirez, S., Casillas, R., Domingo, E., Esteban, J. I., Forns, X., Quer, J. (2015) Quasispecies dynamics in hepatitis C liver transplant recipients receiving grafts from hepatitis C virus infected donors. *J. Gen. Virol.*, **96**:3493-3498.

Perales, C., Quer, J., Gregori, J., Esteban, J.I., Domingo, E. (2015) Resistance of hepatitis C virus to inhibitors: complexity and clinical implications. *Viruses*, **7**:5746-5766.

Gregori, J., Perales, C., Rodríguez-Frías, F., Esteban, J.I., Quer, J., Domingo, E. (2016). Viral Quasispecies Complexity Measures. *Virology*, **493**:227-237.

Valero, M.L., Sabariego, R., Cimas, F., Perales, C., Domingo, E., Sánchez-Prieto, R., Mas, A. (2016) HCV RNA-dependent RNA polymerase interacts with Akt/PKB inducing its subcellular re-localization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**:3540-3550.

Gallego, I., Sheldon, J., Moreno, E., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C.M., Domingo, E., Perales, C. (2016) Barrier-Independent, Fitness-Associated Differences in Sofosbuvir Efficacy against Hepatitis C virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**:3786-3793.

Agudo, R., de la Higuera, I., Arias, A., Grande-Perez, A., Domingo, E. (2016) Involvement of a joker mutation in a polymerase-independent lethal mutagenesis escape mechanism. *Virology* 494:257-266.

De Ávila, A.I., Gallego, I., Soria, M.E., Gregori, J., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C.M., Domingo, E., Perales, C. (2016) Lethal mutagenesis of hepatitis C virus induced by favipiravir. *PLoS ONE*, **11**:e0164691.

Martín, V., Perales, C., Fernández-Algar, M., Dos Santos, H.G., Garrido, P., Pernas, M., Parro, V., Moreno, M., García-Pérez, J., Alcamí, J., Torán, J.L., Abia, D., Domingo, E., Briones, C. (2016) An Efficient Microarray-Based Genotyping Platform for the Identification of Drug-Resistance Mutations in Majority and Minority Subpopulations of HIV-1 Quasispecies. *PLoS ONE*, **11**:e0166902.

Domingo, E. Perales, C. (2016) Viral quasispecies and lethal mutagenesis. *European Review*, **24**:39-48.

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.

Domingo, E. and Perales C. (2014) Virus evolution. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Domingo, E. Perales, C. (2016) Species Concepts: Viral quasispecies. In: Kliman, R.M. (ed) *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Academic Press, Oxford, UK, pp. 228-235.

Domingo, E., Schuster, P. (2016) What is a quasispecies? Historical origins and current scope. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **392**:1-22.

Perales, C., Domingo, E. (2016) Antiviral strategies based on lethal mutagenesis and error threshold. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **392**:323-339.

Domingo, E., de la Higuera, I., Moreno, E., de Ávila, A.I., Agudo, R., Arias, A., Perales, C. (2016) Quasispecies dynamics taught by natural and experimental evolution of foot-and-mouth disease virus. In: Sobrino, F and Domingo E (eds) *Foot-and-Mouth Disease Virus: Current Research and Emerging Trends*. Horizon Scientific Press – Caister Academic Press, Poole, UK, pp. 147-170.

Domingo, E. (2016) Virus as Populations. Composition, complexity, dynamics and biological implications. Academic Press, Elsevier, Amsterdam.

Domingo, E., Schuster, P. (eds) (2016) Quasispecies: From Theory to Experimental Systems. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol.392. Springer, Switzerland.

Sobrino, F. and Domingo, E. (eds) (2016) *Foot-and-Mouth Disease Virus: Current Research and Emerging Trends*, Horizon Scientific Press – Caister Academic Press, Poole, UK.

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).

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

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

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

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

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
David Piedrabuena Estrada
Peter Elias Kidibule
Zoran Merdzo Kunovac
David Rodrigo Frutos

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
María Asunción Martín Redondo

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Eva Castillo Rosa
Cristina Rosco López

Jara Salueña Martín
Carlos Martín de Hijas
Lissa Lutter

Colaboraciones y Científicos
Visitantes / Collaborations
and Visiting Scientists:

Miguel Remacha Moreno
Antonio Jiménez Martínez

Víctor Cifuentes
(Universidad de Chile)
Soledad Gutiérrez Gutiérrez
(Universidad de Chile)

Resumen de investigación

Trabajamos con microorganismos de interés biotecnológico, básicamente hongos y levaduras, productores de compuestos bioactivos (entre ellos 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 en distintos países la aplicabilidad industrial de algunas de las proteínas caracterizadas y diseñado métodos para su fijación a soportes sólidos.

Durante los últimos años hemos estado caracterizando y estudiando 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, 13 y 18. 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. 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>).

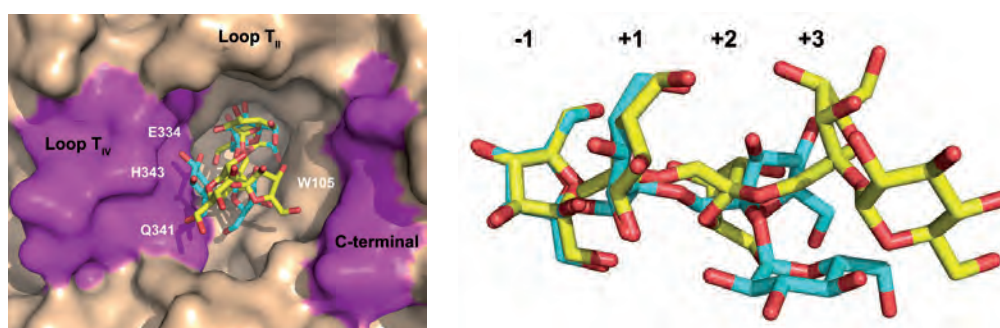


Figura 1. Detalle del centro activo de la fructofuranosidasa Xd-INV de *Xanthophyllomyces dendrorhous* incluyendo nistosa y fructosilnistosa, dos de los productos generados por esta enzima. La plasticidad de su centro activo convierte a Xd-INV en un catalizador flexible que podría utilizarse en la producción de nuevos bioconjugados. A la izquierda se muestra una vista frontal de la cavidad donde se localizan ambos azúcares utilizando la variante proteica Xd-INV D80A. El subsito +1 está flanqueado por los bucles TII y TIV (residuos clave posicionados). Subsito +2 definido esencialmente por el Trp105 y el extremo C-terminal de la cadena proteica. A la derecha se representa una vista lateral de la conformación de la fructosilnistosa (amarillo) y nistosa (azul).

Figure 1. Detail of the fructofuranosidase Xd-INV active site including nystose and fructosyl nystose, both products generated by the native enzyme from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. The plasticity of its active site makes Xd-INV a valuable and flexible biocatalyst to produce novel bioconjugates. Left: frontal view of the cavity including both fructosylated products and the protein variant Xd-INV D80A. Subsite +1 being shaped by the TII and TIV loops (key residues highlighted). Subsite +2 is created by stacking to Trp105 and main chain of the protein C-terminal region. Right: side view of the fructosyl nystose (yellow) and nystose (blue) conformation.

Research summary

We work with microorganisms of biotechnological interest, mainly fungi and yeasts, producers of bioactive compounds (including 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 some of the 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 glycosyl hydrolases (GH) structurally included in family GH32, 31, 13 or 18. Indeed, we 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 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

Flores, O., Alcaíno, J., Fernández-Lobato, M., Cifuentes, V., and Baeza, M. (2015) Characterization of virus-like particles and identification of capsid proteins in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Virus Genes*, **50**, 253-259.

Gimeno-Pérez, M., Linde, D., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J. and Fernández-Lobato, M. (2015) Heterologous overproduction of β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, an enzyme producing prebiotic sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3459-3467.

Gutiérrez-Alonso, P., Gimeno-Pérez, M., Ramírez-Escudero, M., Plou, F.J., Sanz-Aparicio, J. and Fernández-Lobato, M. (2016) Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces dendrorhous* α -glucosidase with potential for prebiotics production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3125-3135.

Ramírez-Escudero, M., Gimeno-Pérez, M., González, B., Linde, D., Merdzo, Z., Fernández-Lobato*, M. and Sanz-Aparicio*, J. (2016) Structural Analysis of β -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* Reveals Unique Features and the Crucial Role of N-glycosylation in Oligomerization and Activity". *J. Biol. Chem.* **291**, 6843-6857.* Both corresponding authors.

Plou, F.J., Polaina, J., Sanz-Aparicio, J. and Fernández-Lobato, M. (2016) β -Galactosidases for lactose Hydrolysis and Galactooligosaccharide Synthesis. *Microbial Enzyme Technology and Food Applications*. CRC Press Taylor and Francis Group. pp 123-146.

Piedrabuena, D., Miguez, N., Poveda, A., Plou, F.J. and Fernández-Lobato, M. (2016) Exploring the transferase activity of Ffase from *Schwanniomyces occidentalis*, a β -fructofuranosidase showing high fructosyl-acceptor promiscuity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 8769-8778.

Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A., Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M. and Cifuentes, V. (2016) The involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in catabolic repression: an active mechanism contributing to the regulation of carotenoid production. *PLoS ONE* **11**:e0162838.

Saugar, I., Molloy, B., Sanz, E., Sánchez, M.B., Fernández-Lobato, M.* and Jiménez, A. (2016) Characterization of the biosynthetic gene cluster (ata) for the A201A aminonucleoside antibiotic from *Saccharothrix mutabilis* subsp. capreolus. *J Antibiot* (Tokyo). (pp: 1-10),* Corresponding author.

Córdova, P., Alcaíno, J., Bravo, N., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., and Cifuentes, V. (2016) Regulation of carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: the role of the transcriptional co-repressor complex Cyc8-Tup1 involved in catabolic repression. *Microb. Cell Fact.* **15**,193-212.

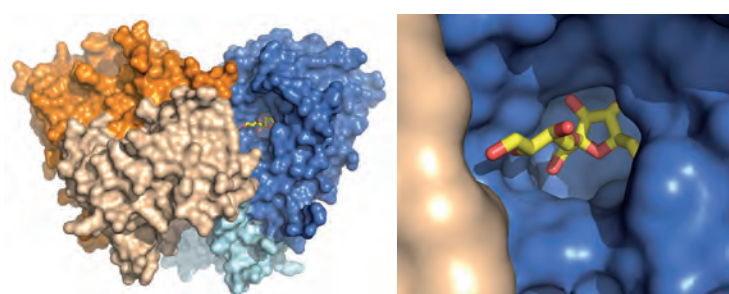


Figura 2. La β -fructofuranosidasa Ffase de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* en complejo con fructosil eritritol. Una proteína dimerica que puede fructosilar distintos tipos de moléculas hidroxiladas. A la izquierda, en azul se muestra el monómero A y en naranja el B (en color oscuro los dominios catalíticos, en claro los β -sándwich). A la derecha se muestra una vista ampliada del centro activo. En amarillo se representa la molécula del producto formado por fructosilación del eritritol.

Figure 2. The β -fructofuranosidase Ffase-fructosyl erythritol-complex. Ffase is a dimeric enzyme from the *Schwanniomyces occidentalis* yeast showing high fructosyl-acceptor promiscuity. On the left, in blue and orange the monomers A and B are shown (in dark colors the catalytic domains and in clear the β -sandwich). A Close-up view of the active site is shown on the right. In yellow the product formed by fructosylation of erythritol is represented.

Ingeniería de Virus y Nanobiotecnología

Virus Engineering and Nanobiotechnology



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Mauricio García Mateu

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
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 virológicos para el estudio del ensamblaje, estabilidad y dinámica conformacionales y propiedades físicas de virus, y sus implicaciones biológicas (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/o estructuralmente modificadas con vistas a aplicaciones en biomedicina y bionanotecnología (Mateu (2016). En Protein-based *Engineered Nanostructures*, Springer 2016, pp.83-120).

Relevancia científica e implicaciones tecnológicas: Conocimiento en profundidad de procesos clave para la infección vírica, incluyendo morfogénesis, reordenamientos estructurales de partículas víricas y desencapsidación; aplicación de este conocimiento al diseño de vacunas, fármacos antivirales, biomateriales y nanopartículas modificadas para usos biomédicos o nanotecnológicos.

Algunos resultados más recientes: i) El uso combinado de microscopía de fuerzas atómicas (AFM) y microscopía electrónica nos ha permitido determinar experimentalmente en detalle, por primera vez, la ruta reversible e intermedios de ensamblaje y desensamblaje la cápsida de un virus esférico estructuralmente sencillo (Fig.1). ii) Mediante análisis mutacional y determinación de las propiedades mecánicas de virus usando AFM, hemos descubierto una relación entre cambios genéticos en la rigidez mecánica de una partícula vírica y cambios en su propensión a experimentar cambios conformacionales importantes para el proceso de infección (Fig.2). iii) Hemos caracterizado la arquitectura, dinámica y propiedades mecánicas de un nanorecubrimiento bidimensional formado por el autoensamblaje de la proteína de la cápsida del virus del SIDA sobre una matriz sólida. Estos y otros estudios del grupo tienen implicaciones para una mejor comprensión de procesos esenciales para la infección por virus, el diseño de nuevos antivirales que interfieran con estos procesos y el desarrollo de nanopartículas y biomateriales bidimensionales de propiedades mecánicas mejoradas para aplicaciones como liberación dirigida de fármacos o regeneración de tejidos.

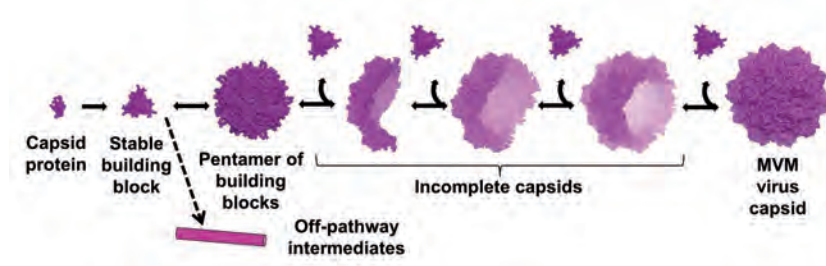


Figura 1. Intermedios durante la ruta de ensamblaje-desensamblaje reversible de la cápsida del virus diminuto del ratón. El ensamblaje procede mediante la formación de un núcleo y la adición gradual de bloques de construcción formados por trómeros de la proteína de la cápsida.

Figure 1. Intermediates during the reversible assembly-disassembly pathway of the minute virus of mice capsid. Assembly proceeds through formation of a nucleus and the gradual association of capsid building blocks formed by trimers of the capsid protein.

Research summary

Major research goals: We use protein engineering techniques and biochemical, biophysical and virological analyses to study assembly, conformational stability and dynamics and physical properties of viruses, and their biological relevance (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/or structurally modified viral particles for the development of biomedical and bionanotechnological applications (Mateu (2016). In *Protein-based Engineered Nanostructures*, Springer 2016, pp.83-120).

Scientific relevance and technological implications: In-depth knowledge of certain key processes for viral infection, including virus morphogenesis, structural rearrangements and uncoating; application of this knowledge for the design of vaccines, antiviral drugs, biomaterials and modified nanoparticles for biomedical or bionanotechnological uses.

Some recent results: i) The combined use of atomic force microscopy (AFM) and electron microscopy allowed us to experimentally determine for the first time the reversible pathway and intermediates of assembly and disassembly of a structurally simple spherical virus capsid (Fig.1). ii) Using mutational analysis and the determination of mechanical properties of virus particles by AFM we have discovered a relationship between genetic changes that alter the mechanical stiffness of virus particles and changes in the propensity of the latter to undergo conformational changes related to the infection process (Fig.2). iii) we have characterized the structure, dynamics and mechanical properties of a bidimensional nanocoating made by self-assembly of the HIV capsid protein on a solid matrix. These and other studies by our group have implications for a better understanding of processes essential for viral infection, the design of new antivirals that may inhibit these processes, and the development of nanoparticles and bidimensional biomaterials with improved mechanical properties for applications such as targeted drug delivery or tissue regeneration.

Publicaciones / Publications

Bocanegra, R., Fuertes, M.A., Rodríguez-Huete, A. and Mateu, M.G. (2015) Biophysical analysis of the MHR motif in folding and domain swapping of the HIV capsid protein C-terminal domain. *Biophys. J.* **108**, 339-349.

Castellanos, M., Carrillo, P.J.P. and Mateu, M.G. (2015). Quantitatively probing propensity for structural transitions in engineered virus nanoparticles by single-molecule mechanical analysis. *Nanoscale* **7**, 5654-5664.

Hernando-Pérez, M., Cartagena-Rivera, A.X., Bozic, A.L., Carrillo, P.J.P., San Martín, C., Mateu, M.G., Raman, A., Podgornik, R. and de Pablo, P.J. (2015). Quantitative nanoscale electrostatics of viruses. *Nanoscale* **7**, 17289-17298.

Rincón, V., Rodríguez-Huete, A. and Mateu, M.G. (2015). Different functional sensitivity to mutation at intersubunit interfaces involved in consecutive stages of foot-and-mouth disease virus assembly. *J.Gen. Virol.* **96**, 2595-2606.

Valbuena, A. and Mateu, M.G. (2015). Quantification and modification of the equilibrium dynamics and mechanics of a virus capsid lattice self-assembled as a protein nanocoating. *Nanoscale* **7**, 14953-14964.

Mateu, M.G. (2016). Assembly, engineering and applications of virus-based protein nanoparticles. In: *Protein-based engineered nanostructures* (Cortajarena, A., Grove, T., eds.), pp. 83-120. Springer, UK.

Medrano M., Fuertes, M.A., Valbuena, A., Carrillo, P.J.P., Rodríguez-Huete, A. and Mateu, M.G. (2016). Imaging and quantitation of a succession of transient intermediates reveal the reversible self-assembly pathway of a simple icosahedral virus capsid. *J. Am. Chem. Soc. (JACS)* **138**, 15385-15396.

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.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Pablo José Pérez Carrillo (2015). Papel de interfases y residuos interfásicos en la elasticidad mecánica y dinámica conformacional de partículas del virus diminuto del ratón. Universidad Autónoma de Madrid. Director/Supervisor: Mauricio García-Mateu.

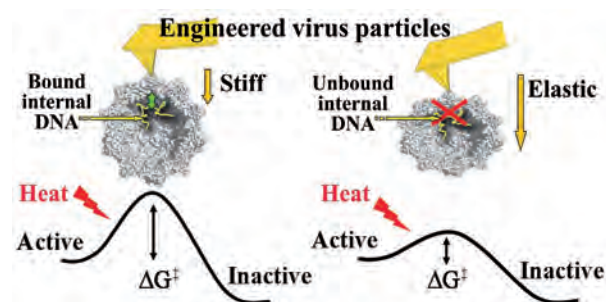


Figura 2. Relación entre un aumento de la rigidez mecánica del virus diminuto del ratón mediado por interacciones cápsida-ácido nucleico, y un aumento en su resistencia a perder infectividad a través de un cambio conformacional inducido por calor. Este virus parece haber desarrollado durante su evolución sitios de interacción entre la pared interna de la cápsida y su genoma, lo que aumenta su rigidez y, en consecuencia, su resistencia a ser térmicamente inactivado en el medio extracelular.

Figure 2. Linear relationship between an increase in mechanical stiffness of the minute virus of mice mediated by capsid-nucleic acid interactions, and an increase in its resistance against loss of infectivity by a heat-induced conformational change. This virus appears to have evolved genome binding sites in the capsid inner wall, which increases its stiffness and, in consequence, its resistance against thermal inactivation in the extracellular medium.

Grupo de Modelado Molecular

Molecular Modelling Group



Jefe de Proyecto / *Project Leader:*
Paulino Gómez-Puertas

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Jesús Mendieta Gómez

Estudiantes Predoctorales /
Graduate Students:
Jesús Ignacio Mendieta Moreno
Íñigo Marcos Alcalde

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Silvia Lusa Bernal

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”.

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). Nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. José Ortega Mateo (Departamento de Física Teórica de la Materia Condensada, UAM), ha desarrollado un nuevo método de simulación QM/MM, llamado FIREBALL/AMBER, 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”.

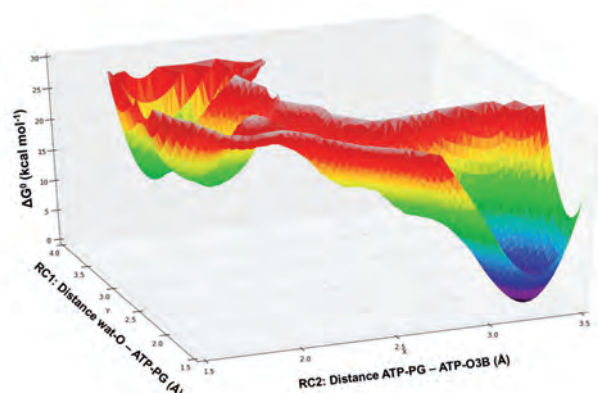


Figura 1. Mapa 3D de superficie de energía de la reacción ATPasa catalizada por las proteínas humanas SMC1A y SMC3, del anillo de cohesinas. Datos generados utilizando FIREBALL / AMBER y analizados utilizando MEPSA (software desarrollado en el laboratorio).

Figure 1. 3D surface-energy map of the ATPase reaction catalyzed by the cohesin ring human proteins SMC1A and SMC3. Data generated using FIREBALL / AMBER and analyzed using MEPSA (software developed in the laboratory).

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.

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). Our group, in collaboration with the group of Dr. José Ortega Mateo (Department of Theoretical Condensed Matter Physics, UAM), has developed a new QM/MM simulation method, called FIREBALL/AMBER, 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

Marcos-Alcalde, I., Setoain, J., Mendieta-Moreno, J.I., Mendieta, J. & Gómez-Puertas, P. (2015). MEPSA: minimum energy pathway analysis for energy landscapes. *Bioinformatics* **31**, 3853-3855.

Salvarelli, E., Krupka, M., Rivas, G., Mingorance, J., Gómez-Puertas, P., Alfonso, C. & Rico, A.I. (2015). The Cell Division Protein FtsZ from *Streptococcus pneumoniae* Exhibits a GTPase Activity Delay. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 25081–25089.

Mendieta-Moreno, J.I., Marcos-Alcalde, I., Trabada, D.G., Gómez-Puertas, P., Ortega, J. & Mendieta, J. (2015). A practical Quantum Mechanics Molecular Mechanics method for the dynamical study of reactions in biomolecules. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **100**, 67-88.

Valdivieso, E., Perteguer, M.J., Hurtado, C., Campioli, P., Rodríguez, E., Saborido, A., Martínez-Sernández, V., Gómez-Puertas, P., Ubeira, F.M. & Gárate, T. (2015). ANISERP: a new serpin from the parasite *Anisakis simplex*. *Parasites & Vectors* **8**, 399.

Martín-García, F., Papaleo, E., Gómez-Puertas, P., Boomsma, W. & Lindorff-Larsen, K. (2015). Comparing molecular dynamics force fields in the essential subspace. *Plos ONE* **10**, e0121114.

Gil-Rodríguez, M.C., ... , Marcos-Alcalde, I., Wesselink, J.-J., Lusa-Bernal, S., ... , Gómez-Puertas, P., ... , & Pié, J. (2015). De novo Heterozygous Mutations in SMC3 Cause a Range of Cornelia De Lange Syndrome-Overlapping Phenotypes. *Human Mutation* **36**, 454-462.

Mendieta-Moreno, J., Trabada, D., Mendieta, J., Lewis, J., Gómez-Puertas, P. & Ortega, J. (2016). Quantum Mechanics / Molecular Mechanics Free Energy Maps and Nonadiabatic Simulations for a Photochemical Reaction in DNA: *Cyclobutane Thymine Dimer*. *Journal of Physical Chemistry Letters* **7**, 4391–4397.

Aguilera Rossi, C.A., Gómez-Puertas, P. & Ayala Serrano, J.A. (2016). In vivo functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* **16**, 234.

Pié, J., Puisac, B., Hernández-Marcos, M., Teresa-Rodrigo, M.E., Gil-Rodríguez, M.C., Baquero-Montoya, C., Bernal, M.L., Bueno, I., Gómez-Puertas, P. & Ramos, F.J. (2016). Special cases in Cornelia de Lange Syndrome: the Spanish experience. *American Journal of Medical Genetics Part C* **172C**, 198-205.

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

Developing genetic tools to modify clinically and industrially relevant Gram+ bacteria by exploring the transfer and other functions of the conjugative *Bacillus* plasmid pLS20



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

Científicos Visitantes / Visiting Scientists: Jian An Hao, Krzysztof Giziński, Ken Ichi Yoshikawa

Becarios Predoctorales / Graduate Students: Gayetri Ramachandran, Andrés Miguel Arribas, César Gago Córdoba, Jorge Val Calvo

Estudiantes / Undergraduate Students: Arantxa López Pérez, Carlos Karan Gurnani, Robin Geiger

Resumen de investigación

Las bacterias intercambian material genético a gran escala a través de diferentes procesos, denominados colectivamente Transferencia Génica Horizontal (TGH). Además de un cromosoma, la mayoría de las bacterias contienen unidades de replicación autónoma llamadas plásmidos. Muchos plásmidos portan genes que les permiten ser transferidos a bacterias libres de plásmidos a través de un proceso de TGH denominado conjugación. Muchos plásmidos conjugativos contienen genes de resistencia a antibióticos (AR), y la conjugación es la ruta principal responsable de la propagación de los genes antibióticos. AR es especialmente preocupante en el microbioma de seres humanos y animales, y la AR es particularmente un problema creciente en Gram+ del fylum Firmicutes. Aunque algunos plásmidos conjugativos de bacterias Gram-negativas han sido estudiados con bastante detalle, se sabe muy poco sobre la conjugación de plásmidos de origen Gram+. La comprensión de los diferentes aspectos del proceso de conjugación es esencial para diseñar estrategias para combatir la propagación mediada por conjugación de la resistencia a los antibióticos. Esta es la razón por la que hemos seleccionado como modelo el plásmido conjugativo pLS20 del Firmicute *Bacillus subtilis*, que forma parte del microbioma de seres humanos y animales. Otro incentivo para estudiar pLS20 es que muchas bacterias Gram+ de importancia científica, industrial o clínica son reacias a la manipulación genética. La conjugación es un método natural para introducir genes en una bacteria receptora. Por lo tanto, en nuestro laboratorio se estudian diferentes aspectos del plásmido pLS20 con dos objetivos. Por un lado, utilizamos pLS20 para construir herramientas para modificar bacterias Gram+. Por otro lado, queremos incrementar nuestra comprensión sobre diferentes aspectos del proceso de conjugación y utilizar este conocimiento para diseñar estrategias para combatir la propagación mediada por conjugación de la resistencia a los antibióticos.

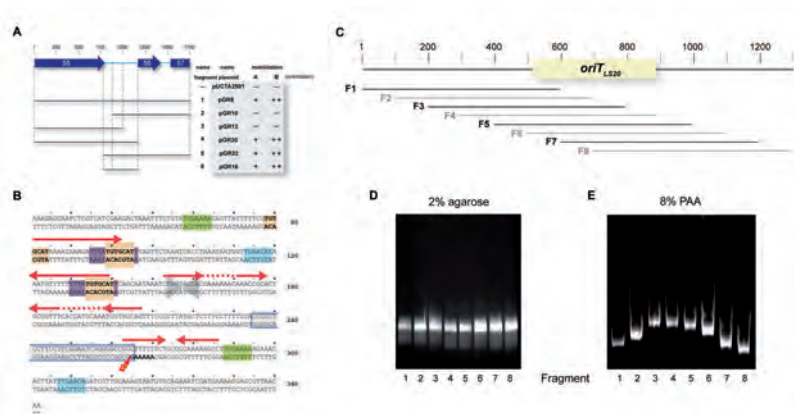


Figura 1. Metodologías utilizadas para identificar y caracterizar la región del DNA que contiene el origen de transferencia (oriT) del plásmido pLS20. A, Estrategia de clonación para identificar el oriT. B, Características de la región de DNA de oriT. C, fragmentos de ADN utilizados para estudiar la curvatura del ADN de oriT. D-E, Prueba experimental de que la región del DNA que contiene el oriT posee curvatura estática.

Figure 1. Methodologies used to identify and characterize the origin of transfer region (oriT) of plasmid pLS20. A, Cloning strategy to identify oriT. B, Features of the oriT sequence region. C, DNA fragments used to study DNA curvature of oriT. D-E, Experimental proof that oriT is statically bent.

Research summary

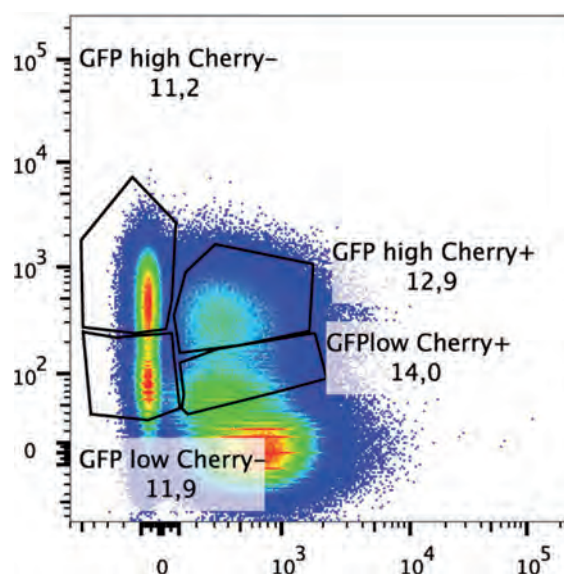
Bacteria exchange genetic material at gross scale through different processes, collectively named Horizontal Gene Transfer (HGT). Besides a single chromosome, most bacteria contain autonomously replicating units called plasmids. Many plasmids carry genes enabling them to be transferred into plasmid-free bacteria via the HGT process named conjugation. Many conjugative plasmids contain antibiotic resistance (AR) genes, and conjugation is the major route responsible for the spread of antibiotic genes. AR is especially becoming worrisome in the microbioma of humans and animals and particularly due to AR bacteria belonging to the Gram positive phylum Firmicutes. Although some conjugative plasmids of Gram negative bacteria have been studied in considerable detail, very little is known about conjugation of plasmids from Gram+ origin. Understanding different aspects of the conjugation process is essential for designing strategies to combat conjugation-mediated spread of antibiotic resistance. That is the reason why we have selected as a model system the conjugative plasmid pLS20 of the Firmicute *Bacillus subtilis*, which forms part of the microbiome of humans and animals. Another incentive for studying pLS20 is that many Gram+ bacteria of scientific, industrial or clinical importance are reluctant to genetic manipulation. Conjugation is a natural method to introduce genes into a recipient bacterium. Hence, in our lab we study different aspects of plasmid pLS20 which serve two goals. On the one hand, we use pLS20 for constructing tools to modify Gram+ bacteria. On the other hand, we want to increase our understanding on different aspects of the conjugation process and use this knowledge for designing strategies to combat conjugation-mediated spread of antibiotic resistance.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Gayetri Ramachandran (2015). Functional characterization of the *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20: identification of relaxosome components and mechanism of transcriptional control of the main conjugation promoter Pc. Universidad Autónoma Madrid. Director: Wilfried J.J. Meijer.

Figura 2. Detección de células donadoras, receptoras y transconjugantes en un cultivo mixto mediante FACS utilizando células donadoras y receptoras marcadas fluorescentemente.

Figure 2. Detection of donor, recipient and transconjugant cells in a mixed culture by FACS using fluorescently labeled donor and recipient cells.



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:
Alba Sebastián Martín

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Paula Castro Trillo
Guillermo García Marquina
María M. Granara
(Universidad de Cagliari, Italia)
Atsushi Konishi
(Universidad de Kyoto, Japón)
Yannick Pelegrín Falcón
María Sánchez Díaz
Enrique Sapena Ventura

Resumen de investigación

A pesar de los éxitos de la terapia antirretroviral, las infecciones causadas por los virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2, respectivamente) son responsables de 1,6 millones de muertes cada año. La retrotranscriptasa (RT) del VIH juega un papel clave en la replicación del ARN genómico vírico y sus inhibidores constituyen la base de los tratamientos más utilizados y eficaces.

Desde hace años, nuestros esfuerzos se han dirigido hacia la determinación de mecanismos moleculares implicados en resistencia a inhibidores de la RT y conocer el papel que juegan distintos aminoácidos en su especificidad de nucleótido y fidelidad de copia. A lo largo de nuestras investigaciones hemos obtenido RTs del VIH-1 que presentan elevada estabilidad térmica y/o fidelidad de síntesis de ADN. Algunas de estas RTs son comercializadas en la actualidad y se usan en distintas aplicaciones biotecnológicas tanto en investigación básica como clínica. Objetivos futuros incluyen el desarrollo de nuevas RTs con elevada afinidad por ácidos nucleicos que pudieran ser útiles en amplificación de ARN a partir de células individuales.

Aunque los análogos a nucleósido constituyen la base de las terapias actuales frente al VIH, las mutaciones asociadas con resistencia a estos inhibidores son diferentes en el VIH-1 y en el VIH-2. Uno de nuestros objetivos es determinar qué aminoácidos son los responsables de estas diferencias.

Actualmente, la prevalencia de mutaciones de resistencia está aumentando en los países menos desarrollados, lo que hace pensar que se necesitarán nuevos fármacos antirretrovirales que exploten otras dianas del ciclo replicativo del VIH. En este sentido, también estamos interesados en la actividad ribonucleasa H de la RT, y en identificar factores del hospedador que pudieran comprometer la eficacia replicativa del VIH.

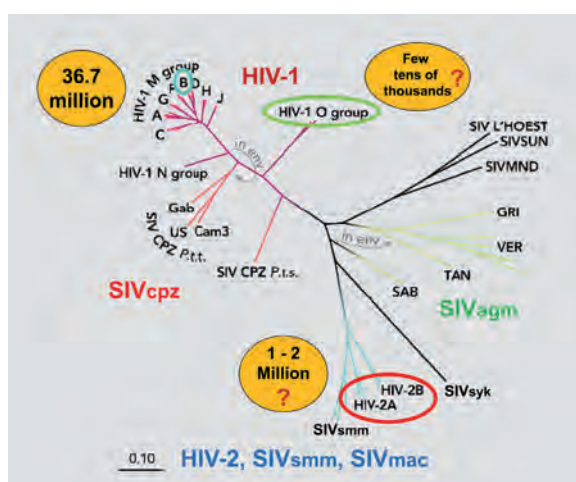


Figura 1. Árbol filogenético de virus de la inmunodeficiencia de distintos primates. En el laboratorio se estudian variantes de la RT del VIH-1 grupo M/subtipo B y grupo O, así como del VIH-2 grupos A y B.

Figure 1. Phylogenetic relationships between immunodeficiency viruses of different primates. In our lab, we study the biochemistry of RT variants of HIV-1 group M/subtype B and group O, as well as HIV-2 groups A and B.

Research summary

Infections caused by human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 (HIV-1 and HIV-2, respectively) constitute a major burden to human health worldwide. 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 therapies.

For years, our efforts have been directed towards achieving two major goals: (1) the elucidation of molecular mechanisms involved in RT inhibitor resistance; and (2) understanding the role of different amino acids in the nucleotide specificity of HIV-1 and HIV-2 RTs, as well as in their fidelity of DNA synthesis. We have engineered HIV-1 RT variants with increased thermal stability and high fidelity that are currently marketed as biotechnological tools for many applications, covering basic and translational research. Future challenges involve the development of RTs with high nucleic acid binding affinity suitable for RNA amplification from single cells.

HIV-2 shows natural resistance to nonnucleoside RT inhibitors (NNRTIs) and several protease inhibitors. Nucleoside RT inhibitors (NRTIs) constitute the backbone of therapies against HIV. However, HIV-1 and HIV-2 show different mutational pathways of NRTI resistance. We are currently trying to identify the molecular determinants that lead to the development of different sets of NRTI resistance-associated mutations in both enzymes.

On the other hand, prevalence of drug-resistant HIV strains is increasing in less developed countries. Therefore, we anticipate an increasing interest in unexploited targets of antiretroviral intervention. In this context, RNase H activity and inhibition, as well as host factors that could eventually block HIV-1 replication are also important topics of research in our laboratory.

Publicaciones / Publications

Betancor, G., Álvarez, M., Marcelli, B., Andrés, C., Martínez, M.A. and Menéndez-Arias, L. (2015) Effects of HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations on polypurine tract removal and initiation of (+)-strand DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **43**, 2259-2270.

Fernández-Oliva, A., Finzi, A., Hillel, H., Menéndez-Arias, L., Sodroski, J. and Pacheco, B. (2016) HIV-1 adapts to replicate in cells expressing common marmoset APOBEC3G and BST2. *J. Virol.* **90**, 725-740.

Corona, A., Meleddu, R., Esposito, F., Distinto, S., Bianco, G., Ma-saoka, T., Maccioni, E., Menéndez-Arias, L., Alcaro, S., Le Grice, S.F.J. and Tramontano, E. (2016) Ribonuclease H/DNA polymerase HIV-1 reverse transcriptase dual inhibitor: mechanistic studies on the allosteric mode of action of isatin-based compound RMNC6. *PLoS ONE* **11**, e0147225.

Pacheco, B., Menéndez-Arias, L. and Sodroski, J. (2016) Characterization of two distinct early post-entry blocks to HIV-1 in common marmoset lymphocytes. *Sci. Rep.* **6**, 37489.

Clotet, B., Menéndez-Arias, L., Schapiro, J.M., Kuritzkes, D., Burger, D., Rockstroh, J., Brun-Vezinet, F., Boucher, C.A. and Richman, D.D. (eds.) (2016) The HIV & Hepatitis Drug Resistance and PK Guide. Fifteenth Edition. Fundació de Lluita contra la SIDA, Barcelona, Spain, 765 pp. Available from: <http://www.flsida.org/theguide>.

Otras actividades / Other activities

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

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

Patentes / Patents

L. Menéndez Arias, T. Matamoros, D. Abia, V. Barrioluengo. Retro-transcriptasas del VIH tipo 1 grupo O, activas a temperaturas elevadas / HIV-1 group O reverse transcriptases, active at high temperatures. Ref.: PCT/ES2014/070389; WO 2014184409 (A1). Propietario/ Owner: C.S.I.C. País/Country: Spain, EU, USA. US patent awarded on Aug. 30, 2016: US 9,428,738 B2. Licenciario/Licensee: Sygnis/ Expedeon.

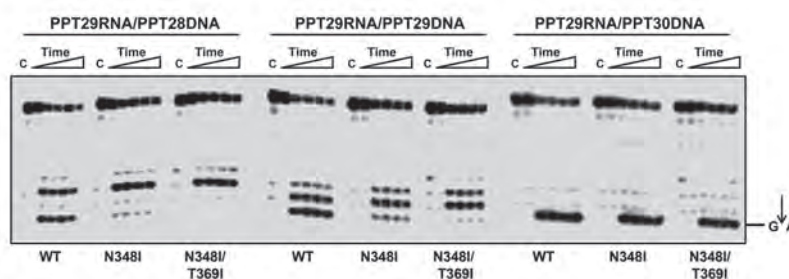


Figura 2. Efecto de cambios de aminoácido en la RT del VIH-1 sobre la especificidad de corte de la ribonucleasa H (Betancor et al. 2015; *Nucleic Acids Res.* **43**, 2259).

Figure 2. Effect of amino acid substitutions in the HIV-1 RT on ribonuclease H cleavage patterns of RNA/DNA complexes (Betancor et al. 2015; *Nucleic Acids Res.* **43**, 2259).

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

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

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Elena Riera Laguna
Raquel García Belmonte
Antonio Vallejo Peinador
Wael Obeid

Resumen de investigación

La Peste Porcina Africana (PPA) reviste una gran amenaza para la industria alimentaria a nivel mundial, puesto que el virus se extiende desde las repúblicas Bálticas y Rusia, llegando a Polonia y amenazando a toda la UE. Hasta la fecha no existen vacunas seguras y eficaces frente a PPA y las estrategias de control se basan en la detección temprana del virus y en el sacrificio masivo de los animales.

El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) es un virus ADN de doble cadena de gran tamaño, que regula la respuesta inflamatoria e inmune del huésped. Además, los monocitos y macrófagos alveolares son el huésped natural de la infección, complicando el desarrollo de la vacuna, ya que dichas células desempeñan un papel central en la respuesta inmune.

La experimentación con células primarias tiene inconvenientes obvios y así, uno de nuestros objetivos, es el establecimiento de líneas porcinas de origen mieloide susceptibles a la infección. Uno de los mecanismos de interacción virus-célula objeto de estudio es el control viral del complejo adaptador celular AP-1, encargado del tráfico intracelular, y cuya regulación podría tener importantes repercusiones en la virulencia.

Además, en recientes proyectos de la Unión Europea (ASFRISK (2008-2011) y ASFORCE (2012-2015)), las estrategias desarrolladas por nuestro laboratorio encaminadas a la obtención de una vacuna, se han basado en la modificación de las cepas atenuadas del VPPA eliminando genes tales como A238L o A276R (respectivamente inhibidores de factores pro inflamatorios e IFN I), en un intento de reducir la viremia y los efectos secundarios del virus atenuado.

Finalmente, con el objetivo de desarrollar una vacuna de subunidades a medio plazo, nos proponemos analizar la presentación antigénica de epítomos virales durante la infección, así como la regulación de factores celulares implicados, tales como el proteasoma o las enzimas Erap.

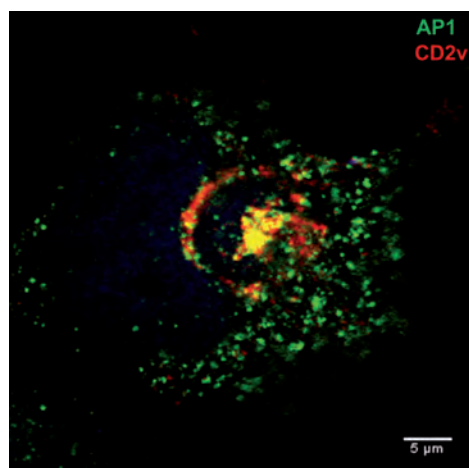


Figura 1. La proteína CD2 de VPPA colocaliza con el adaptador celular AP-1 durante la infección con la cepa E70 de VPPA en células COS.

Figure 1. ASFV CD2 colocalizes with the cellular Adaptor protein AP-1, during ASFV-E70 infection in COS cells.

Research summary

African swine fever (ASF) poses a major threat to the global food industry as the virus spreads from the Baltic republics and Russia, into Poland and threatens the entire EU. To date, there are no safe and effective vaccines against ASF and control strategies are based on the early detection of the virus and on the massive slaughter of animals.

African Swine Fever Virus (ASFV) is a large double-stranded DNA virus, which regulates the host's inflammatory and immune response. In addition, monocytes and alveolar macrophages are the natural host of the infection, complicating the development of the vaccine, as these cells play a central role in the immune response.

Experimentation with primary cells has obvious drawbacks and thus, one of our objectives is the establishment of porcine cell lines of myeloid origin susceptible to infection. One of the mechanisms of virus-cell interaction under study is the viral control of the cellular adapter complex AP-1 responsible for intracellular trafficking, and whose regulation could have important repercussions on virulence.

In addition, in recent projects of the European Union (ASFRISK (2008-2011) and ASFORCE (2012-2015), the strategies developed by our laboratory to obtain a vaccine have been based on the modification of the attenuated strains of the ASFV eliminating genes such as A238L or A276R (respectively inhibitors of proinflammatory factors and IFN I) in an attempt to reduce viremia and the side effects of the attenuated virus.

Finally, with the aim of developing a subunit vaccine for medium-term, we propose to analyze the antigenic presentation of viral epitopes during infection, as well as the regulation of cellular factors involved, such as proteasome or Erap enzymes.

Publicaciones / Publications

Zakaryam, H., Revilla, Y. (2016). African swine fever virus: current state and future perspectives in vaccine and antiviral research. *Veterinary Microbiology* **15**, 15-19.

Bello Morales, R., Crespillo, J., Praena, B., Tabarés, E., Revilla Y., García Sánchez, E., Fraile-Ramos, A., Baron, W., Krummenacher, C., López-Guerrero, J. A. (2016) Role of Proteolipid Protein in HSV-1 Entry in Oligodendrocytic Cells. *PLoS One* **25**, 11-17

Pérez Núñez, D., García Urdiales, E., Martínez Bonet, M., Nogal, M.L., Barroso, S., Revilla, Y., Madrid, R. (2015). CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection. *PLoS One* **10**, 1-19.

Gallardo C, Soler A, Nieto R, Sánchez MA, Martins C, Pelayo V, Carrascosa A, Revilla Y, Simón A, Briones V, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M. (2015). Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transbound Emerg Dis.* **62**:612-22.

Otras actividades / Other activities

Yolanda Revilla Novella, ASFORCE Scientific Committee Member. Comisión Europea 2015.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ana Quintas Gorozarri. "Regulación del proceso de traducción durante la infección viral". Universidad Autónoma de Madrid. Universidad Autónoma de Madrid. 18 de Junio 2015 (sobresaliente Cum laude). Directora: Yolanda Revilla Novella.

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:
Miguel Rodríguez
Patricia de León

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María José Bustos
(Desde diciembre 2016)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Flavia Caridi
Rodrigo Cañas

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Katherine I. Calderón
Laura Sotillos
Dulce María Hernández
Melisa Fuentes
Collin Joyce

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 cómo 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 humores 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, el virus de la rinitis equina A y el virus de la estomatitis vesicular. 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 ha estudiado también el papel que juegan diferentes lípidos celulares en la multiplicación de estos virus y de otros virus animales, como el virus del Nilo Occidental. Como parte de estos estudios se ha continuado caracterizando 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).

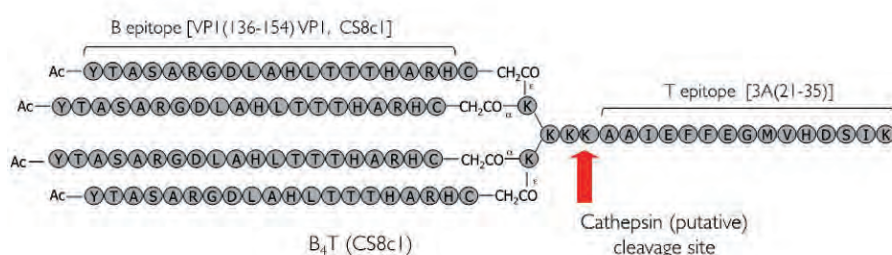


Figura 1. Esquema del primer prototipo de péptido dendrimérico capaz de conferir protección completa frente al desafío con VFA en cerdo. Las secuencias corresponden al aislado de VFA de serotipo C (Cubillos et al., J. Virol 82, 7223, 2008).

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).

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 peptide marker vaccines that can induce protective humoral and cellular immune responses, using the pig, an important natural host, as an animal model. 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, vesicular stomatitis virus and equine rhinovirus A. Special attention has been paid to the functional implications of non-structural proteins in virus virulence and host range. The role of different cellular lipids in the multiplication of these and other viruses such as West Nile virus, responsible for an important zoonosis, has also been addressed. As part of these studies, we have characterized 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 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

Caridi, F., Vázquez-Calvo, A., Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (2015). The pH stability of foot-and-mouth disease virus particles is modulated by residues Located at the pentameric interface and in the N terminus of VP3. *J. Virol.* **89**, 5663-5642.

Ferrer-Orta, C., de la Higuera, I., Caridi, F., Sánchez-Aparicio, M.T., Moreno, E., Perales, C., Singh, K., Sarafianos, S.G., Sobrino, F., Domingo, E. and Verdaguer, N. (2015). Multifunctionality of a picorna-virus polymerase domain: nuclear localization signal and nucleotide recognition. *J. Virol.* **89**, 6848-6859.

Borrego, B., Rodríguez-Pulido, M., Revilla, C., Álvarez, B., Sobrino F., Domínguez, J. and Sáiz, M. (2015). Synthetic RNAs mimicking structural domains in the foot-and-mouth disease virus (FMDV) genome elicit a broad innate immune response in porcine cells triggered by RIG-I and TLR activation. *Viruses* **7**, 3954-3973.

González-Magaldi, M., G. de la Torre, B., Vázquez-Calvo, A., Valle, J., Andreu, D. and Sobrino, F. (2015). Peptides interfering 3A protein dimerization decrease FMDV multiplication. *PLoS ONE* **10**, e0141415.

Merino-Ramos, T., Vázquez-Calvo, A., Casas, J., Sobrino, F., Saiz, J.C. and Martín-Acebes, M.A. (2016). Modification of host cell lipid metabolism by hypolipidemic drugs targeting the acetyl-CoA carboxylase impairs West Nile virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 307-315.

Crespillo A. J., Praena B., Bello-Morales R., Lerma L., Vázquez-Calvo A., Martín-Acebes M.A., Tabarés E., Sobrino F. and López-Guerrero J.A. (2016). Inhibition of herpes virus infection in oligodendrocyte cultured cells by valproic acid. *Virus Res.* **214**, 71-79.

Martín-Acebes, M.A., Gabandé-Rodríguez, E., García-Cabrero, A.M., Sánchez, M.P., Ledesma, M.D., Sobrino, F. and Saiz, J.C. (2016). Host Sphingomyelin Modulates West Nile Virus Infection *in vivo*. *J. Lipid. Res.* **57**, 422-32.

Vázquez-Calvo, A., Sáiz, J.C., Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (2016). First Complete Coding Sequence of a Spanish isolate of Swine Vesicular Disease Virus. *Genome Announcements* **4**:e01742.

Blanco E., Guerra, G., de la Torre, B.G., Defaus, S., Andreu, D. and Sobrino, F. (2016). Full protection of swine against foot-and-mouth disease challenge by a bivalent B-cell epitope dendrimer peptide. *Antiviral Res.* **129**, 74-80.

Martín-Acebes M., Blázquez A.B., Cañas-Arranz R., Vázquez-Calvo A., Merino-Ramos T., Escribano-Romero E., Sobrino F., Saiz J.C. (2016). A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine* **34**, 2066-2073.

Vázquez-Calvo, A., Caridi, F., González-Magaldi, M., Saiz, J.C. Sobrino, F. and Martín-Acebes, M.A. (2016). The amino acid substitution Q65H in the 2C protein of swine vesicular disease virus confers resistance to Golgi disrupting drugs. *Frontiers Microbiol.* **7**:612.

Caridi, F., Cañas-Arranz, R., Vázquez-Calvo, A., Sobrino, F., Martín-Acebes, M.A. (2016). Equine rhinitis A virus mutants with altered acid resistance unveil a key role of VP3 and intra-subunit interactions in the control of the pH stability of an Aphthovirus capsid. *J. Virol.* **90**, 9725-9732.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Yuri A. Vieira (2015). Contribuciones al estudio de la funcionalidad de proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa. Universidad Autónoma de Madrid. Directores M.F. Rosas y F. Sobrino.



Figura 2. Localización de los residuos de aminoácido (esferas) que modifican la estabilidad de la cápsida del virus de la rinitis equina (Caridi et al., 2016).

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.

Estructura del mRNA y control traduccional en sistemas biológicos

mRNA structure and translational control in biological systems



Jefe de Línea / Group Leader:

Iván Ventoso

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Irene Díaz

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Ramiro Vicente

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Beatriz Álvarez

Resumen de investigación

Durante los dos últimos años, hemos tratado de entender cómo los mRNAs de los Alfavirus son capaces de iniciar la traducción en células de mamífero de un modo independiente del factor de iniciación eIF2, y la relevancia de este mecanismo en la evolución y adaptación de estos virus a los hospedadores vertebrados. Nuestros resultados sugieren que este proceso probablemente implicó la adquisición de estructuras de RNA situadas por detrás del codón de iniciación del mRNA viral que interaccionan con la región ES6S del ribosoma durante el proceso de scanning, promoviendo la parada del ribosoma sobre el codón de iniciación. Hemos observado que los mRNA celulares como el de beta-globina también interaccionan con la región ES6S del ribosoma durante el proceso de scanning, lo que indica que esta región del ribosoma posiblemente constituye la puerta de entrada del ribosoma por donde el mRNA penetra durante el scanning. Mediante experimentos de crosslinking e immuno microscopía electrónica, hemos podido localizar la helicasa eIF4A sobre la región ES6S de la subunidad 40S durante el proceso de iniciación, lo que nos ha permitido proponer un modelo topológico y mecanístico del complejo de iniciación de la traducción.

Aprovechando nuestros conocimientos sobre la traducción de estos virus, estamos evaluando también la capacidad oncotrópica que algunos Alphavirus exhiben de manera natural (Auravirus) o mediante la modificación genética de virus Sindbis y SFV, con el objetivo de usarlos para destruir tumores humanos.

Nuestro interés último es entender cómo la célula responde al estrés, adaptando tanto los niveles globales de traducción como aquellos que afectan a ciertos mRNAs específicos, y la implicación de esta respuesta adaptativa en procesos como la respuesta antiviral, envejecimiento y cáncer. Para abordar estas cuestiones, recientemente hemos creado una iniciativa (stress lab) que integra a otros grupos del CBMSO para trabajar conjuntamente en estas cuestiones.

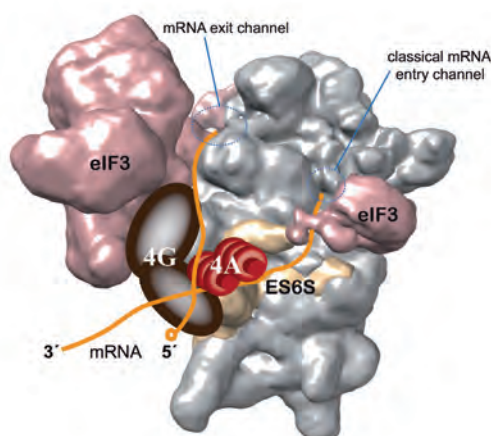


Figura 1. Modelo topológico del complejo de preiniciación (PIC) 48S durante el proceso de scanning. El mRNA se ilustra en naranja, rodeando el cuello de la subunidad ribosomal 40S, mientras que la región ES6S del 40S se ilustra en amarillo. La localización del complejo eIF4F (4G y 4A) se situaría entre la región ES6S y el eIF3, contactando el mRNA tanto sobre la región entrante (3') como sobre la saliente (5').

Figure 1. Topological model of preinitiation complex (PIC) 48S during the scanning process. mRNA is colored in orange, wrapping the neck of 40S ribosomal subunit, whereas the 40S ES6S region is colored in yellow. The location of eIF4F (4G and 4A) is placed between ES6S region and eIF3, contacting both the incoming (3') and lagged (5') regions of mRNA. Only the solvent side of the complex is shown.

Research summary

During the last two years, we have tried to understand how Alphavirus mRNAs can be translated in an eIF2-independent manner in infected cells, and the role that this mechanism might have played in virus evolution and adaptation to vertebrate hosts. Our data suggest that this adaptation likely involved the acquisition of RNA structures downstream the AUG of viral mRNA that interact with ES6S region of ribosomal 40S subunit during the scanning process, stalling the initiation complex on the initiation codon. We also found that cellular mRNAs as beta-globin can also interact with ES6S region of 40S in cell free systems, suggesting that this region could be acting as the gateway to the ribosome. Using crosslinking assays and immuno-electron microscopy, we were able to locate the helicase eIF4A on the ES6S region of 48S initiation complex assembled in vitro with viral and cellular mRNAs, which has led us to propose a topological and mechanistic model of initiation complex during the scanning process. Taking advantage of our knowledge on translation of these virus in infected cells, we are also evaluating the oncolytic activity showed by some members of this family of viruses against human tumors.

Our ultimate goal is to understand how cells respond to stress by adapting global and mRNA-specific translation, and the implications of this adaptive response in ageing, cancer and antiviral response. To address these questions, we have recently launched a joint venture with other CBMSO groups (stress lab) to work together on these topics of general interest.

Publicaciones / Publications

Toribio, R., Díaz-López, I., Boskovic, J., and Ventoso, I. (2016) An RNA trapping mechanism in Alphavirus mRNA promotes stalling and translation initiation. *Nuc. Acids Res.* **44**, 4368-4380.

Toribio, R., Díaz-López, I., and Ventoso, I. (2016) New insights into the topology of the scanning ribosome during translation initiation: Lessons from viruses. *RNA Biol.* **13**, 1223-1227.

Berlanga, J.J., de Haro, C., Rodríguez-Gabriel, M.A. and Ventoso, I. (2016) eIF2alpha kinases and the evolution of stress response in eukaryotes. In: Hernández, G. and Jagus, R. (eds) *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and its Regulation*. Springer, pp261-276.



11 Grupos / 11 Groups

- | | | |
|-----|---|--|
| 96 | ANTONIO BAONZA CUENCA | Identificación de mecanismos genéticos y moleculares que controlan la regeneración en <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>Identification of molecular and genetic mechanisms involved in the control of regeneration in Drosophila melanogaster</i> |
| 98 | PAOLA BOVOLENTA
NICOLAO | Morfogénesis y Diferenciación del Sistema Nervioso de Vertebrados
<i>Morphogenesis and Differentiation of the Vertebrate CNS</i> |
| 100 | ANA MARÍA DE BUSTURIA
JIMENO | Regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo de <i>Drosophila</i>
<i>Epigenetic regulation of gene expression during Drosophila development</i> |
| 102 | SONSOLES CAMPUZANO
CORRALES | Base molecular y celular de la organogénesis en <i>Drosophila</i>
<i>Molecular and cellular basis of Drosophila organogenesis</i> |
| 104 | JOSÉ F. DE CELIS | Señalización celular durante el desarrollo de epitelios en <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>Signalling pathways directing epithelial development in Drosophila</i> |
| 106 | ISABEL GUERRERO VEGA | Mecanismos de señalización en el desarrollo
<i>Signaling mechanisms in development</i> |



Desarrollo y Regeneración

Development and Regeneration

- | | |
|---|--|
| 108 FERNANDO JIMÉNEZ
DÍAZ-BENJUMEA | Bioingeniería de enzimas de levaduras para generar
compuestos bioactivos
<i>Yeast enzymes bioengineering to generate bioactive compounds</i> |
| 110 FERNANDO MARTÍN
BELMONTE | Laboratorio de polaridad epitelial
<i>Epithelial polarity laboratory</i> |
| 112 GINÉS MORATA PÉREZ | Control genético de la morfogénesis en <i>Drosophila</i>
<i>Genetic control of morphogenesis in Drosophila</i> |
| 114 MAR RUIZ GÓMEZ | Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en
<i>Drosophila</i> : sistemas muscular y excretor
<i>Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular
and excretory systems</i> |
| 116 ERNESTO SÁNCHEZ-HERRERO
ARBIBE | Especificación segmental y formación de patrón en <i>Drosophila</i>
<i>Segmental specification and pattern formation in Drosophila</i> |

Identificación de mecanismos genéticos y moleculares que controlan la regeneración en *Drosophila melanogaster*

*Identification of molecular and genetic mechanisms involved in the control of regeneration in *Drosophila melanogaster**



Jefe de Línea / Group Leader:
Antonio Baonza Cuenca

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

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Sergio Benjamín Velarde Rangel
Javier Barrio Pérez
Sara Ahmed de Prado

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Sofía de La Oliva Rodríguez
Paloma Narros Fernández

Resumen de investigación

Uno de los problemas más intrigantes en biología es entender cómo un organismo puede reemplazar órganos o porciones de sus cuerpos cuando estos resultan dañados. Esta capacidad, conocida como regeneración, difiere mucho entre diferentes especies, e incluso entre distintos órganos dentro de un mismo organismo, o diferentes momentos durante el desarrollo. Se han utilizado diferentes sistemas modelo para estudiar los procesos biológicos que regulan la regeneración. Estos estudios han permitido la identificación de múltiples procesos celulares. Sin embargo, se sabe mucho menos sobre los mecanismos genéticos que los controlan. Parte de la razón de esta brecha en nuestra comprensión se debe a que las técnicas genéticas disponibles en muchos de los organismos modelos utilizados son muy limitadas. Nuestro proyecto tiene como objetivo profundizar en la comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares que controlan la regeneración. Estamos especialmente interesados en conocer los mecanismos genéticos fundamentales involucrados en el declive de la capacidad regenerativa que se produce durante el desarrollo. Con este fin, utilizamos un sistema genético especialmente adecuado - los discos imaginales de *Drosophila*. Diferentes estudios han demostrado que estas estructuras epiteliales tienen capacidad regenerativa que se pierde a lo largo del desarrollo. Uno de los objetivos de nuestro proyecto es aprovechar las nuevas herramientas genéticas desarrolladas en *Drosophila*, para identificar genes y "elementos potenciadores de la regeneración tisular" que operan en estadios regenerativos de *Drosophila*, pero que son inactivos a medida que los animales se desarrollan. Esperamos utilizar este conocimiento para definir los mecanismos moleculares que pueden estar limitando la capacidad regenerativa. Debido a que las vías de señalización y su regulación están altamente conservadas entre las moscas y los vertebrados, esperamos que nuestro trabajo ayude a establecer mecanismos genéticos y moleculares básicos involucrados en el control de la regeneración en distintos organismos.

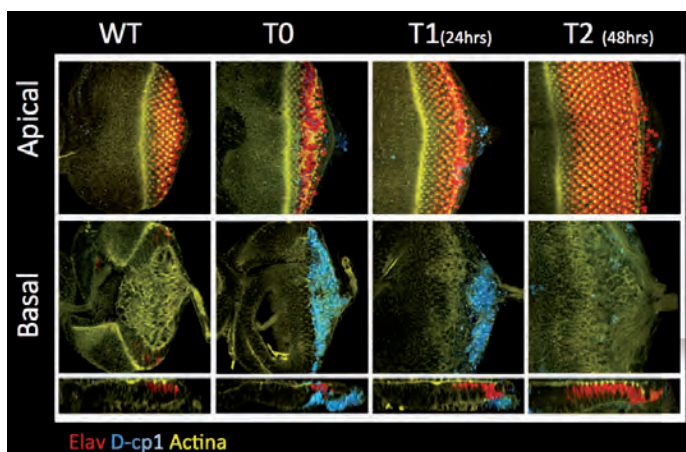


Figura 1. Proceso de reparación de un disco imaginal de ojo tras ablación genética. Los fotorreceptores están marcados en rojo y las células muertas en azul.

Figure 1. Recovery process of an imaginal eye discs after genetic ablation. Photoreceptors are marked in red and dead cells in blue.

Research summary

One of the most intriguing problems in biology is how an organism can replace missing organs or portions of their bodies after injuries. This capacity, known as regeneration, differs greatly across organs and organisms, and includes a wide range of phenomena, from wound healing to the induction of cellular reprogramming. A range of model systems has been used to study regeneration. These analysis have allowed the identification of multiple cellular processes that occur during regeneration. However, much less is known about the genetic mechanisms that control them. Part of the reason for this gap in our understanding is that the genetic approaches for the study of regeneration in many of the classical model organisms are difficult to implement. Our project aims to deepen the understanding of the genetic and molecular mechanisms underlying tissue regeneration. We are especially interested into to learn about the fundamental genetic mechanisms involved in the decline of the regenerative ability that occurs during the development. To this end, we propose to use an especially amenable genetic system – the *Drosophila* imaginal discs. Different studies have shown that these epithelial structures are a suitable tissue to study the mechanisms that control regeneration. One of the goals of our project is to exploit the new genetic tools developed in *Drosophila*, for identifying genes and “tissue regeneration enhancer elements” TREs that operate in regenerative stages of *Drosophila*, but that are inactive as animals develops. We expect to use this knowledge to gain insight into new molecular mechanisms that can be involved in limiting the regenerative ability. Because the signalling pathways and their regulation are highly conserved between flies and vertebrates, *Drosophila* is a good model system in which genetic and molecular mechanistic can be established, and then translated into other organisms.

Publicaciones / Publications

Díaz-García, S., Ahmed, S., and Baonza, A. (2016). Analysis of the function of apoptosis during the regeneration of the imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. Nov 28, **11**, e0165554

Estella, C., and Baonza, A. (2015). Cell proliferation control by Notch signalling during imaginal discs development in *Drosophila*. *AIMS Genetics*. 2015, **2**, 70-96.

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
Florencia Cavodeassi Madarro

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows:*

Viviana Gallardo
Polynikis Kaimakis
Luisa Sánchez Arrones

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:

Javier Rueda Carrasco
María Hernández Bejarano
Tania Moreno Mármol

Inés Mateo Ruiz

Lara Durán Trío

(Hasta Julio 2015)

Francisco Javier Nieto López

(Hasta Julio 2015)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

M^a Jesús Martín Bermejo
África Sandonís Consuegra
Noemí Tabanera Anguita

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Cristina Navarrete Hernández
Teresa De Los Reyes Corrales
Rocío Vera Rachón
Adrián Nogales

Resumen de investigación

Utilizando abordajes multidisciplinares en pez y ratón, nuestro grupo investiga los procesos genéticos y morfogénicos que coordinan el desarrollo temprano del prosencéfalo, centrándonos en procesos causantes de trastornos congénitos de su desarrollo. Además estudiamos la función de una familia de proteínas difusibles, llamadas Secreted Frizzled Related Proteins (Sfrps), durante el desarrollo y la homeostasis del cerebro.

En este periodo, identificamos parte de los elementos *trans*-reguladores que controlan la expresión espacio-temporal de *Six3*, un factor de transcripción que pertenece a la red de regulación génica implicada en la especificación prosencefálica. También contribuimos a establecer que, en la cromatina, la familia de los genes *Six*, a la cual *Six3* pertenece, está organizada en dos paisajes reguladores independientes, contenidos en dos dominios topológicos adyacentes, esenciales para la correcta expresión de cada gen *Six*. En un estudio colaborativo demostramos además que el factor de transcripción *Meis1* controla una cascada génica responsable del crecimiento ocular, pudiendo ser un gen causante de microftalmia en humanos. Por otro lado, demostramos que el esbozo ocular adquiere identidad en el eje naso-temporal, gracias a las vías de señalización de *Fgfs* y *Shh*, respectivamente. En paralelo, contribuimos a establecer que estas vías están también implicadas en iniciar la especificación de la médula espinal ventral.

En línea con estudios recientes donde concluimos que las Sfrps, además de modular la vía de señalización de Wnts, inhiben la actividad de la metaloproteasa ADAM10, demostramos que *Sfrp1/2* regulan la proteólisis mediada por ADAM10 de distintas proteínas de guía axonal, permitiendo así a los axones de las células ganglionares de la retina seguir su trayectoria correcta. Actualmente estudiamos la contribución de *Sfrp1* a los procesos neurodegenerativos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Por último, aportamos nuestros conocimientos en neurobiología a un trabajo que demuestra la eficacia de una nueva droga que podría tratar enfermedades autoinmunes.

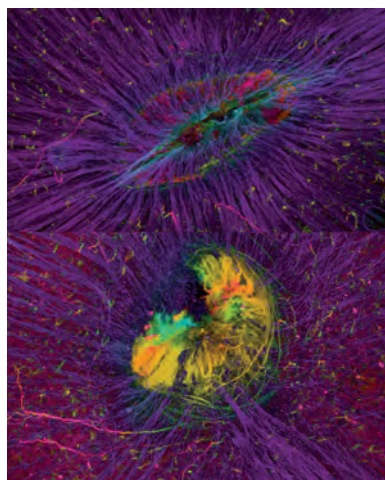


Figura 1. Imagen confocal de retinas abiertas de un embrión de ratón silvestre (panel de arriba) o carente de *Sfrp1/2* (panel de abajo). Los distintos colores representan la profundidad del corte óptico mostrando así la ruta aberrante de los axones de las células ganglionares de la retina a nivel de disco óptico (amarillo-verde) y del la capas internas de la retina (rosa) en los mutantes en comparación con la organización radial (violeta) en el embrión silvestre.

Figure 1. Confocal image of flat-mounted retina from WT (top) and *Sfrp1/2* DKO (bottom) mouse embryo, showing retinal ganglion cell axons. Colors reflect the depth of the confocal layer and highlight axon misrouting at the optic disc (yellow-green) and in the inner layer of the retina (pink) in the DKO as compared to the arrayed organization (violet) of the WT.

Research summary

Our group investigates the genetic and dynamic events underlying forebrain development, focusing on aspects that may cause associated congenital disorders. We are also interested in understanding how a family of diffusible proteins, named Secreted Frizzled Related Proteins (Sfrps) contribute to the development and adult homeostasis of the brain. We tackle these issues with multidisciplinary approaches applied to fish and mouse models.

In the reporting period, we identified part of the trans-regulatory code that controls the spatio-temporal expression of *Six3*, a transcription factor with a central role in the gene regulatory network driving forebrain specification. We also contributed to define that, in the chromatin, the *Six* genes' family, to which *Six3* belongs, is organized in two largely independent regulatory landscapes contained in two adjacent topological associating domains, essential for the proper expression of each family member. In a parallel collaborative study, we showed that the transcription factor *Meis1* is at the top of a genetic cascade controlling eye growth, thus representing a candidate gene to explain mammalian microphthalmia. Furthermore, we addressed how the eye primordium acquires naso-temporal identity, identifying *Shh* signalling as an essential regulator of temporal identity, in contraposition to *Fgf* signalling that confers a nasal character. We also contributed to a study demonstrating that the same signalling pathways work in a loop to initiate ventral spinal cord patterning.

Following our recent demonstration that *Sfrps* are not only *Wnt* signalling modulators but also inhibitors of the metalloprotease *ADAM10*, we reported that *Sfrp1/2* control *ADAM10*-mediated proteolysis of different guidance cues, thereby enabling the proper growth of mouse retinal ganglion cell axons along their pathway. Currently, we investigate how *Sfrp1* contributes to the neurodegenerative features characteristic of Alzheimer's disease. Finally, we brought about our neurobiology knowledge in a study that demonstrated the efficacy of a promising new drug for treating autoimmune diseases.

Publicaciones / Publications

Marcos S., Nieto-López F., Sandonis A., Di Marco, F., Cardozo M., Esteve, P. and Bovolenta P. (2015) Secreted Frizzled Related Proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms. *J. Neurosci.* **35**, 4729-4740 (cover caption article).

Saftig, P.* and Bovolenta, P.* (2015) Proteases at work: Cues for understanding neural development and degeneration. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 13. *co-correspondence.

Gómez-Marín C, Tena JJ, Acemel RD, López-Mayorga E, Naranjo S, de la Calle-Mustienes E, Maeso I, Beccari L, Aneas, I, Vielmas E, Bovolenta P., Nobrega, M.A, Carvajal JJ, Gómez-Skarmeta JL (2015) Evolutionary comparison reveals that diverging CTCF sites are signatures of ancestral topological associating domains borders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 7542-7547.

Marcos, S. González, M., Beccari, L., Carramolino, L., Martín-Bermejo MJ, Amarie O, Mateos-San Martín D., Torroja C, Bogdanovic O, Dooan R., Puk O, Hrabě de Angelis M, Graw J, Gomez-Skarmeta JL, Casares F, Torres M.*, and Bovolenta P.* (2015) *Meis1* coordinates a network of genes implicated in eye development and microphthalmia. *Development* **142**, 3009-3020 * co-senior authors.

Beccari L., Marco-Ferreres R., Tabanera N., Souren M., Wittbrodt B., Conte I, Wittbrodt J. and Bovolenta P. (2015) A trans-regulatory code for the forebrain expression of *Six3.2* in the medaka fish. *J. Biol. Chem.* **290**, 26927-26942

Hernández-Bejarano, M*, Gestri G*, Spawls, L., Nieto-López F, Picker A, Tada M, Brand M, Bovolenta P., Wilson SW, and Cavodeassi F (2015) Opposing *Shh* and *Fgf* signals initiate nasotemporal patterning of the retina. *Development* **142**, 3933-3942. (* co-authors) (cover caption article)

Morales AV, Espeso-Gil S., Ocaña I., Nieto-López F., Bovolenta P., Lewandoski M., and Díez del Corral R. (2016) FGF signaling enhances a *Shh* negative feedback loop to control initiation of spinal cord ventral patterning. *Dev. Neurobiol.* **76**, 956-971.

Borrito, A., Reyes-Garau, D., Jimenez M.A., Carrasco, E., Moreno, B., Martínez-Pasamar, S., Cortes, J., Perona, A, Abia, A., Blanco, S., Fuentes, M., Arellano, I., Lobo, J., Heidarieh, H., Rueda-Carrasco, J., Esteve, P., Cibrán, D., Martínez-Riño, A, Mendoza, P., Prieto, C., Calleja, E., Oeste, C., Orfao, A., Fresno, M., Sanchez-Madrid, F., Alcami, A. Bovolenta, P., Martín, P., Villoslada, P., Morreale, A., Messegue, A. and Alarcon, B. (2016) First-in-class inhibitor of the TCR for the treatment of autoimmune diseases. *Sci Transl Med*, **8**, 370ra184i.

Cavodeassi, F., Moreno-Marmol, T., Hernandez-Bejarano, M and Bovolenta, P. (2016) Principles of early vertebrate forebrain formation. In: Organogenetic gene networks. Castelli-Gair Hombria, J and Bovolenta P. editors, Springer. pp 299-317.

Castelli-Gair Hombria, J and Bovolenta P (2016) Models for studying Organogenetic gene networks in the 21st century. In: Organogenetic gene networks. Castelli-Gair Hombria, J and Bovolenta P. editors, Springer. pp 1-7.

Otras actividades / Other activities

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

Several members of our group participate in outreach activities, i.e. Semana de la ciencia 2015-2016.

J. Castelli-Gair Hombria and P. Bovolenta co-editors of the book: Organogenetic gene networks. Springer. (2016)

P. Bovolenta member of the organizing committee: XI Congress SEBD (Sociedad Española de Biología del Desarrollo). Girona, October 19-21, 2016.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Lara Durán Trío (2015). Brain alterations in Lafora Disease mouse models. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Co-Dirección: S. Rodríguez de Córdoba y Paola Bovolenta.

Francisco Nieto-López (2015). Papel de *Boc* y *Sfrp1/2* en la especificación y guía de los axons de las células ganglionares de la retina. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Dirección: Paola Bovolenta.

Inmaculada Crespo (2016). Función de *Sfrp1* y *Sfrp2* en el desarrollo de la corteza cerebral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Co-Dirección: Pilar Esteve y Paola Bovolenta.

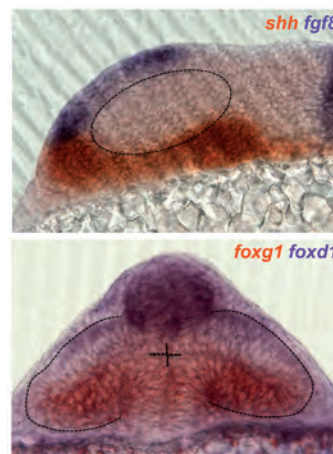
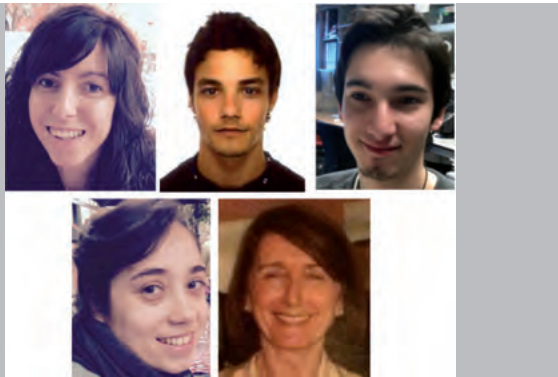


Figura 2. Expresión complementaria de los genes *Shh* y *Fgf8* (panel de arriba) y de sus genes dianas *Fox* (panel de abajo) en embriones de pez cebra en estadio de 10ss, mientras se establece la especificación del eje naso-temporal del esbozo ocular.

Figure 2. Double in situ hybridisation in 10ss zebrafish embryos showing the domains of expression of *Shh* and *Fgf8* (top) as well as of their *Fox* gene targets (bottom) during the establishment of the naso-temporal axis of the developing eye.

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:
Rocío Simón Sacristán

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Carolina Joana Simoes da Silva Pereira

Estudiantes / *Undergraduate Students:*
Ismael Sospedra Arufat
Javier Jiménez Holguín

Resumen de investigación

La investigación en nuestro laboratorio está enfocada al estudio de la regulación de la expresión génica mediada por las proteínas epigenéticas del grupo Polycomb (PcG) y por los microRNAs. Usamos *Drosophila* como sistema modelo. En particular, estamos enfocados en el análisis de las funciones dependientes e independientes de la transcripción mediadas por PcG y en el entendimiento del circuito regulador entre PcG y microRNAs.

PcG controlan las modificación post-trasduccional de las histonas, como la ubiquitinación, que impacta la compactación de la cromatina y por tanto la transcripción génica. Analizamos los mecanismos de plasticidad cromatínica, mediados por la proteína dRYBP, que confiere reversibilidad dependiente de la transcripción. Además, estudiamos la funciones independientes de la transcripción mediadas por PcG en el control de la ubiquitinación de proteínas para su degradación via proteosoma, mediante el análisis del papel de PcG en la apoptosis dependiente de p53 inducida por estrés celular.

Cambios en niveles de PcG y microRNAs afectan drásticamente el desarrollo de los organismos y están involucrados en la generación de patologías humanas. Sin embargo, se desconoce como los niveles de PcG están controlados y como los microRNAs están involucrados en este proceso. Estudiamos la función de los microRNAs en el control de los niveles de PcG mediante la identificación de microRNAs unidos a 3'-UTRs de PcG. Además, analizamos el impacto que la variación de los niveles de PcG tiene sobre los microRNAs induciendo tumores epigenéticos intestinales y caracterizando microRNAs contenidos en exosomas de la hemolinfa.

PcG y microRNAs están filogenéticamente conservados así que los resultados de nuestras investigaciones impactarán en el entendimiento de su función en otros organismos, incluidos los humanos. Además, entender el circuito regulador microRNAs-PcG llevará a entender la función de microRNAs exosómicos como vehículos de la comunicación entre órganos y su papel en la génesis y progresión de enfermedades.

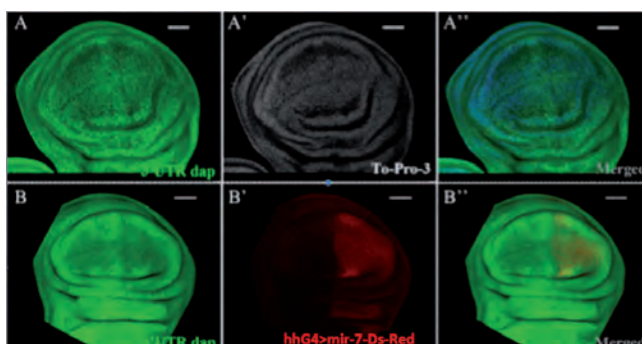


Figura 1. El microRNA-7 regula la expresión de *dacapo* en el disco imaginal de ala.

Figure 1. The microRNA-7 regulates *dacapo* expression in the wing imaginal disc.

Research summary

Research in our laboratory is focused on the study of the regulation of gene expression mediated by the Polycomb (PcG) group of epigenetic proteins and by microRNAs. We use *Drosophila* as a model system. Current studies are particularly focused on the analysis of the chromatin dependent and independent functions of the PcG proteins as well as on the understanding of the Polycomb-microRNAs regulatory circuit.

PcG proteins function by controlling post-translational modification of histones, such as ubiquitylation, which impacts chromatin compaction and thereby gene transcription. We analyze the mechanisms of chromatin plasticity mediated by the dRYBP protein that confers transcriptional dependent reversibility. Furthermore, we study the independent of transcription PcG function in the control of protein ubiquitylation for proteasomal degradation by analyzing the role of PcG in p53 protein dependent apoptosis induced by cellular stress.

Changes in levels of PcG and microRNAs levels have drastic effects on organismal development and are involved in the generation of human pathologies. However, little is known about how PcG levels are controlled and how microRNAs are involved in this process. We study the role of the microRNAs in the control of PcG levels by directly identifying microRNAs that bind to the 3'UTRs of PcG. Additionally, the impact of variations of PcG levels on microRNAs expression is analyzed by the induction of intestinal epigenetic tumors and subsequent isolation and characterization of the microRNAs contained in the hemolymph exosomes.

As the microRNAs and PcG proteins are highly conserved throughout the animal kingdom, our research will yield results that directly impact on the understanding of the function of these factors in other organisms, including humans. Moreover, understanding the microRNAs-PcG regulatory circuit will lead to a more complete understanding of the mechanisms underlying exosome-dependent inter-organ communication and their role in the genesis and progression of human diseases.

Publicaciones / Publications

Aparicio, R,* Simoes da Silva,* C., Busturia A (2015) The microRNA mir-7 contributes to the control of *Drosophila* wing growth. *Developmental Dynamics* 244:21-30. *equal contribution.

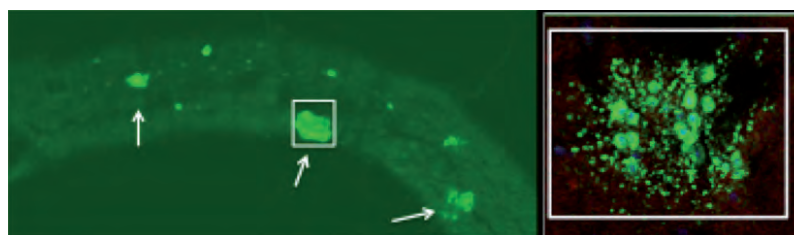
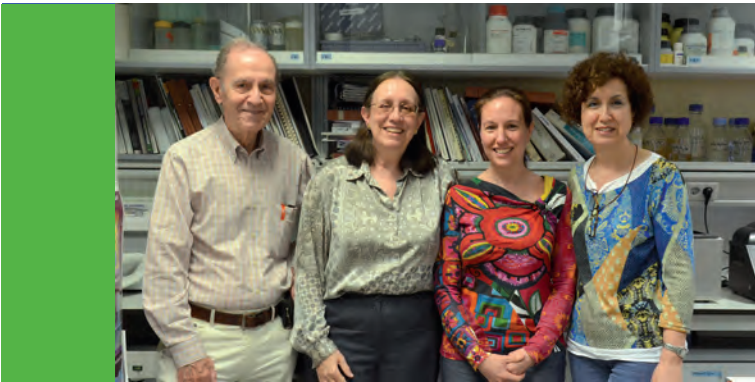


Figura 2. La inactivación de factores epigenéticos en el intestino adulto de *Drosophila* produce tumores intestinales.

Figure 2. The inactivation of epigenetic factors in the adult *Drosophila* gut induces intestinal tumors.

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:

Natalia Barrios López
(Hasta diciembre 2015)
Esther González Pérez
(Hasta julio 2015)

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Rosario Hernández Baeza

Resumen de investigación

Las estructuras adultas de *Drosophila* se especifican en los discos imaginales, formados por dos epitelios contiguos: el disco propio y el epitelio peripodial (EP). Aunque la organogénesis de las estructuras adultas depende mayoritariamente de la expresión génica en el disco propio, cada vez es más evidente la relevancia de la expresión génica en el EP para este proceso. En el disco de antena, los genes *Iroquois* (*Iro*) se expresan exclusivamente en el EP dorsal, separado por un pliegue de las células que no los expresan (Figura 1A). Hemos investigado la contribución de esta expresión peripodial de los genes *Iro* a la morfogénesis de la cabeza. Las células del EP que los expresan dan lugar a un dominio de la cápsula cefálica (Figura 1B, C). Estos genes regulan la cito-arquitectura de todo el EP del disco, que se encuentra reducido en su parte anterior y drásticamente reorganizado en mutantes *iro*. La estructura anormal de los discos se traduce en la reducción de la cutícula cefálica ventral y en fallos en la evaginación del palpo maxilar, aunque éste se especifica correctamente (Figure 2). Además, este estudio nos ha permitido definir un dominio discreto del disco de antena que interviene específicamente en la eversión del palpo maxilar.

Hemos demostrado que las tres homeoproteínas *Iro* controlan la proliferación celular mediante un mecanismo, independiente de la transcripción y basado en la interacción de estas proteínas, mediada por sus dominios IRO-box y de unión a ciclinas, con complejos proteicos que contienen Ciclina E. Hemos generado moscas transgénicas que expresan formas mutantes de *caupolican*, uno de los tres genes *Iro* (mutantes en el homeodominio, la IRO-box o la región de unión a ciclinas) para determinar en qué procesos de desarrollo actúa como regulador de la expresión génica y en cuáles lo hace controlando el ciclo celular.

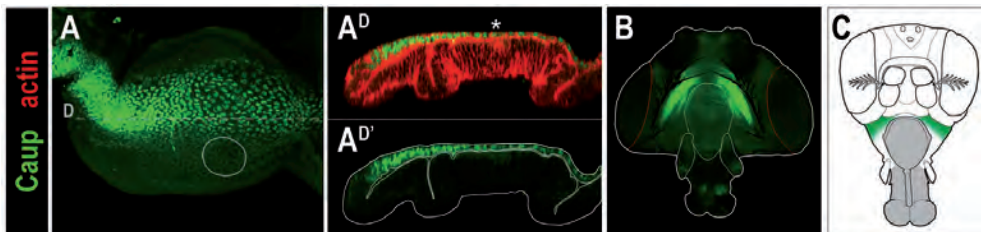


Figura 1. (A- A'') Expresión de *ara/caup* en disco de antena de tipo silvestre, visualizada por tinción con anticuerpo anti-Caup (en verde). El disco está teñido también con faloidina (en rojo) para revelar la actina cortical. A, reconstrucción de la expresión en todo el disco, A' y A'', cortes ópticos realizados al nivel marcado con una línea en A. El asterisco indica las células peripodiales que expresan *ara/caup*. (B) Expresión de *ara/caup*, visualizada por la expresión de GFP en una cabeza adulta *araGal4-rf209*; UAS-GFP. (C) Esquema de una cabeza en el que se muestra (en verde) el dominio de expresión de *ara/caup* en la membrana rostral.

Figure 1. (A- A'') Expression of *ara/caup*, visualized with anti-Caup staining (green) in wild-type antennal disc. Disc is counterstained with phalloidin (red) to visualize cortical actin. A, confocal Z-projection, A' and A'', optical sections at the level indicated by the line in A. Asterisk marks peripodial *ara/caup*-expressing cells. (B) Expression of *ara/caup*, visualized by GFP expression in *araGal4-rf209*; UAS-GFP adult head. (C) Cartoon of an adult head illustrating the *ara/caup* expression domain in the rostral membrane (coloured in green).

Research summary

Drosophila adult structures are specified in the imaginal discs, which are formed by two contiguous epithelia: the disc proper and the peripodial epithelium (PE). Organogenesis of the adult structures relies on the expression of several genes in the disc proper. Increasingly evidence indicated, however, the relevance of gene expression in the PE for organogenesis. In the antennal disc, the *Iroquois* (*Iro*) genes are expressed exclusively in the dorsal PE, separated by an epithelial fold from *Iro* non-expressing cells (Figure 1). We have addressed the contribution of this peripodial *Iro* expression to head morphogenesis. PE *Iro*-expressing cells give rise to a head capsule domain (Figure 1B, C). These genes regulate the cytoarchitecture of the whole PE of the antennal disc, which appears reduced in size at its anterior part and drastically reorganized in *iro* mutant discs. The abnormal structure of the disc results in adults with a severe reduction of the ventral head cuticle and, in addition, in the failure to properly evaginate of an otherwise correctly specified maxillary palp organ (Figure 2). Moreover, this study has allowed us to define a discrete domain of the antennal disc specifically involved in maxillary palp eversion.

We have shown that the three *Iro* homeodomain-containing proteins are able to control cell proliferation by a transcription-independent mechanism. Such control relies on the physical interaction of *Iro* proteins with CyclinE-containing complexes through their IRO-box and Cyclin-binding domains. We have generated transgenic flies able to express mutant forms of caupolican, one of the three *Iro* genes (mutant at the homeodomain, the IRO-box or the Cyclin-binding box) to determine in which developmental processes *Caup* acts as regulator of gene expression and in which ones it does so controlling cell cycle progression.

Publicaciones / Publications

Barrios, N., González-Pérez, E., Hernández, R. and Campuzano, S. (2015) The Homeodomain Iroquois Proteins Control Cell Cycle Progression and Regulate the Size of Developmental Fields. *PLoS Genet.* **11**(8):e1005463.

Barrios, N and Campuzano S. (2015) Expanding the Iroquois genes repertoire: a non-transcriptional function in cell cycle progression. *Fly* (Austin) **9**(3):126-31.

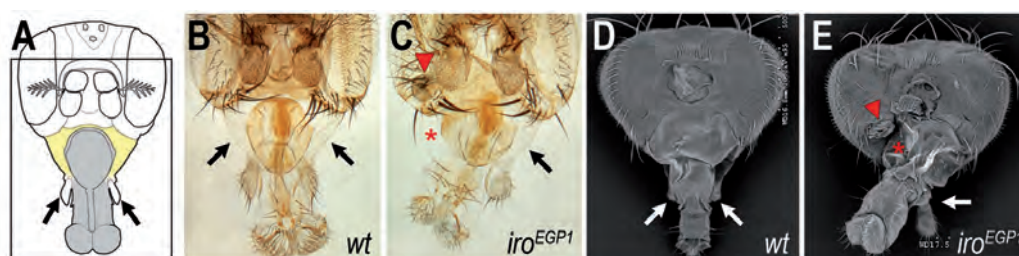


Figura 2. Las moscas *iro^{EGP1}* presentan graves defectos en la parte ventral de la cabeza.

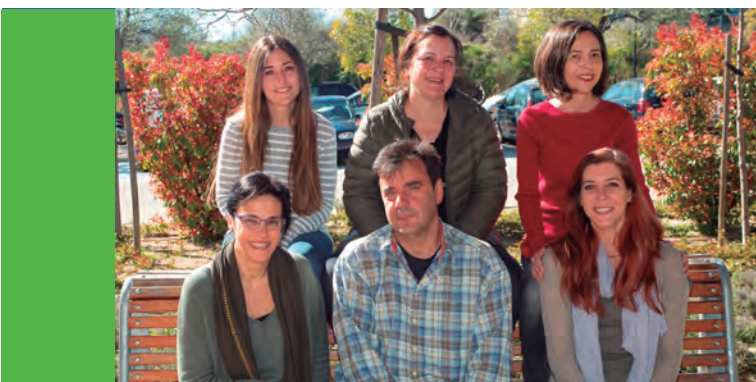
(A) Esquema de una vista frontal de una cabeza adulta. La membrana rostral se señala en amarillo y la probóscide en gris. La caja delimita la región de la cabeza que se muestra en B y C. Las flechas señalan los palpos maxilares. (B-E) Cabezas de moscas adultas de tipo silvestre (B, D) o *iro^{EGP1}* (C, E). (D, E) Imágenes de microscopía electrónica de barrido. En todos los paneles las flechas indican la membrana rostral y palpo maxilar normales, los asteriscos señalan la falta del palpo maxilar y membrana rostral, y las puntas de flecha señalan vesículas cuticulares que se observan dentro de la cabeza (C) o estructuras cuticulares anormales que se desarrollan en la postgena (E). Ambas estructuras presentan características de palpo maxilar.

Figure 2. - *iro^{EGP1}* flies show severe ventral head defects

(A) Cartoon of a front view of an adult head. The rostral membrane is coloured in yellow and the proboscis in grey. The box delimits the head region shown in B, C. Arrows point at the maxillary pals. (B-E) Adult heads from wild-type (B, D) and *iro* mutant (C, E) flies (D, E) Scanning electron microscope images. In all panels arrows indicate normal rostral membrane and maxillary palp, asterisks mark loss of maxillary palp and rostral membrane, and arrowheads point to cuticular vesicles inside the head (C) and abnormal cuticular structures in the postgena (E). Both structures show palp-like characteristics.

Señalización celular durante el desarrollo de epitelios en *Drosophila melanogaster*

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 Varela

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Mercedes Martín Fernández
(Hasta junio 2016)
Covadonga Fernández Hevia
(Hasta diciembre 2015)
Cristina Martínez Oсталé

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Nuria Esteban Delgado

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Patricia Vega
Gonzalo Soto
(Hasta junio de 2016)
Laura Sanz
(Hasta junio de 2016)

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, generación y estudio de condiciones de falta y ganancia de función de los genes de interés, estudios inmunocitoquímicos 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 las 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.

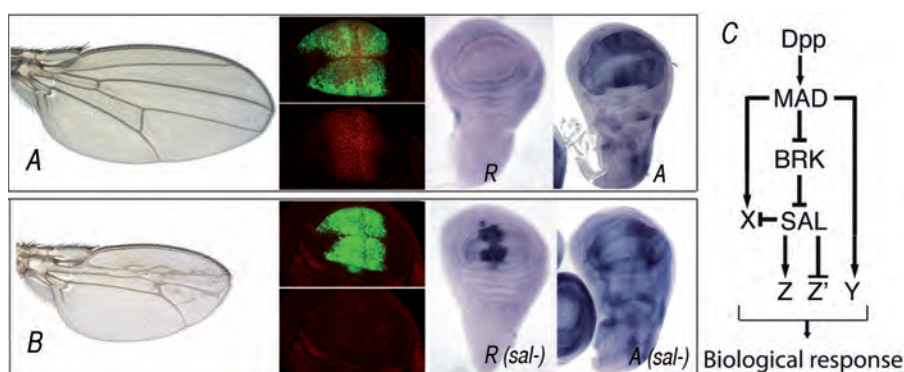


Figura 1. (A) Ala normal (izquierda), disco imaginal de ala de genotipo *sal-G4 UAS-GFP/tub-Gal80ts* (medio) mostrando la expresión de Sal (rojo) y GFP (verde), y discos imaginales mostrando la expresión de un gen reprimido (R) y de un gen activado (A) por Sal. (B) Ala mutante para los genes *sal* (izquierda), disco imaginal de ala de genotipo *sal-G4 UAS-GFP/tub-Gal80ts; UAS-sal-RNAi/UAS-sal-RNAi* mostrando la expresión de Sal (rojo) y GFP (verde), y discos imaginales mostrando la expresión de los genes reprimido (R) y activado (A) por Sal en individuos mutantes para *sal* y *salr*. (C) Modelo de regulación génica iniciado por la ruta de señalización Dpp y su gen diana Sal en el disco imaginal de ala (Organista et al., 2015).

Figure 1. (A) Control wing (left), wing disc of *sal-G4 UAS-GFP/tub-Gal80ts* genotype showing the expression of Sal (red) and GFP (green), and imaginal discs showing the expression of a gene repressed (R) and a gene activated (A) by Sal. (B) Sal mutant wing (left), wing disc of *sal-G4 UAS-GFP/tub-Gal80ts; UAS-sal-RNAi/UAS-sal-RNAi* genotype showing the expression of Sal (red) and GFP (green), and expression of the genes repressed and activated by Sal [R(sal-) and A(sal-), respectively], in wing discs mutant for the genes *sal*. (C) Model of gene regulation initiated by the Dpp pathway and its target gene Sal in the wing disc (Organista et al., 2015).

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, generation and 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.

Publicaciones / Publications

Organista, M.F., Martín, M., de Celis, J.M., Barrio, R., López-Varea, A., Casado, M., Esteban, N. and de Celis, J.F. (2015). The Spalt Transcription Factors Generate the Transcriptional Landscape of the *Drosophila melanogaster* Wing Pouch Central Region. *PLOS GENETICS*: 11:e1005370.

Martín, M., Organista, M.F. and de Celis, J.F. (2016). Structure of developmental gene regulatory networks from the perspective of cell fate-determining genes. *Transcription* 6: 32-37.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Mercedes Martín Fernández (2016). Análisis de los genes y mecanismos que median las funciones de las proteínas Spalt en el ala de *Drosophila*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Jose F. de Celis.

Covadonga Fernández Hevia (2015). Función de la ruta de señalización TGF β /Activina en el control del crecimiento durante el desarrollo en *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Jose F. de Celis.

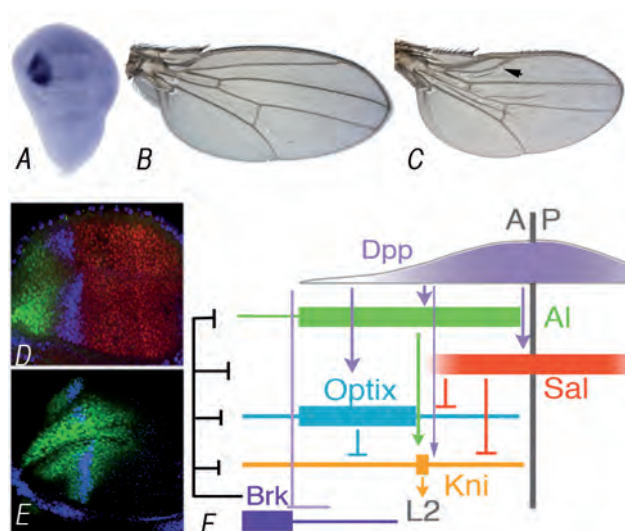


Figura 2. Expresión de mRNA del gen *optix* en el disco imaginal de ala (A). Este epitelio da lugar al ala de la mosca (B), y en ausencia de *optix* la posición de la vena mas anterior se desplaza hacia el borde del ala (flecha en C). La expresión del gen que define esta vena (*Kni*; azul en D y E) se regula por represión mediada por los factores de transcripción Sal (rojo en D), Optix (verde en D) y por activación de AI (verde en E). La expresión de este conjunto de factores de transcripción a su vez está regulada por la ruta de señalización Dpp/BMP formando una red compleja de regulación génica (F).

Figure 2. Expression of *optix* mRNA in the wing disc (A). This epithelial tissue gives rise to the wing (B), and in the absence of *optix* expression (C), the most anterior vein differentiates in a more anterior position (arrow in C). The expression of *kni* in this vein (blue in D and E) is regulated by Sal (red in D) and Optix (green in D) repression and by AI (green in E) activation. The expression of these transcription factors is regulated by the Dpp/BMP signalling pathway, resulting in a complex network of gene regulation (F).

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:
Laura González Méndez
Sheila Jordan Álvarez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Eléonor Simon
Irene Seijo Barandearán
Julia Duque Lloredo
Jaime Jurado Gómez
Adrián Aguirre Tamaral

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Carmen Ibáñez Pérez
M. Carmen Rodríguez-Navas

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Gustavo Aguilar Ortega
M^a Luisa Macías Muñoz
Sergio Fernández de la Puebla
Jorge Arias Vaamonde
Julia López de Andrés
Sara Colomo Del Pino

Profesor de Universidad Asociado /
Associated University Professor:
Esteban Montejo de Garcini

Profesor Invitado / *Invited Professor:*
Pedro Ripoll Quintas

Resumen de investigación

La comunicación celular es clave durante el desarrollo y tiene lugar de una forma precisa. Alteraciones en su regulación son las causas más frecuentes de las malformaciones, los trastornos neurológicos y el cáncer. Durante la diferenciación y crecimiento varias moléculas de señalización funcionan como mensajeros en la comunicación celular. 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 es mediada por citonemas o filopodios especializados. Nuestra hipótesis es que las células no neuronales intercambian proteínas señalización mediante un contacto celular directo durante la morfogénesis de una forma similar a 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 del gradiente morfogenético de Hh, y que los exosomas son los portadores Hh en el transporte y la secreción mediada por citonemas.

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.

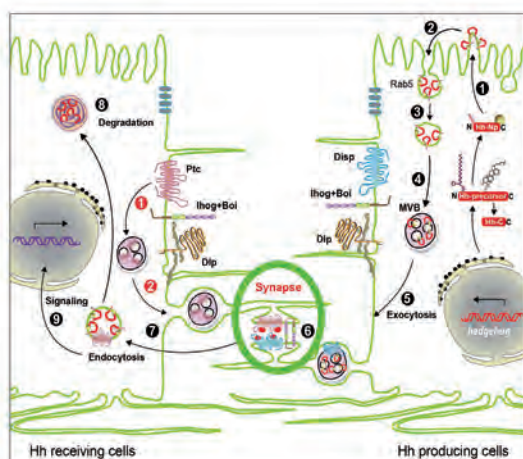


Figura 1. La recepción de Hedgehog mediada por el contacto célula-célula a través de citonemas entre las células receptoras y las presentadoras.

Representación esquemática de una célula productora de Hh (panel derecho) y una célula receptora Hh (panel izquierdo) en las etapas de producción, procesamiento, movimiento y recepción de Hh. (1) Transcripción, procesamiento, modificaciones lipídicas de Hh y su externalización apical; (2) internalización mediada por (3) Dynamin y Rab 5; (4) reciclaje para formar cuerpos multivesiculares mediado por Rab 4, 8, 11; (5) liberación mediada por Disp, Dlp, Ihog, Boi; (6) transporte mediado por Ihog, Boi y Shf; (7) recepción mediada por el complejo receptor de Ptc, Dlp, Ihog, Boi; (8) degradación lisosomal; Y (9) transducción de señales y activación de diana. La interacción de los receptores y complejos de presentación Hh podría ocurrir a lo largo de cytonemes como un proceso similar al sináptico (círculo verde).

Figure 1. Hedgehog reception by cell-cell contact between receiving and presenting cells.

Schematic representations of a Hh producing cell (right panel) and a Hh receiving cell (left panel) in *Drosophila*. 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) release mediated by Disp, Dlp, Ihog, Boi; (6) transport mediated by Ihog, Boi and Shf; (7) the receptor complex of Ptc, Dlp, Ihog, Boi; (8) lysosomal degradation; and (9) signal transduction and target activation. The interaction along cytonemes of the two complexes for reception and presentation of Hh could occur as a synaptic-like process (green circle).

Research summary

Cell-to-cell communication is a key event that occurs in a precise manner during normal development, and its misregulation can cause 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 signalling molecules act as morphogens. The graded distribution of morphogens and the ability of the receptor cells to respond specifically to different ligand concentrations are tightly regulated processes. Cytonemes or specialized filopodia have recently proposed to mediate long distant signalling. Our hypothesis is that during morphogenesis non-neuronal cells exchange signalling proteins at sites of direct contact between cells, similar to neuronal synapses, facilitating 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.

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 focus on the role of cytonemes in this coordination.

Publicaciones / Publications

Simon E, Guerrero I. (2015). The transcription factor optomotor-blind antagonizes *Drosophila* haltere growth by repressing decapentaplegic and hedgehog targets. *PLoS One*. **10**:e0121239.

Machado PF, Duque J, Étienne J, Martínez-Arias A, Blanchard GB, Gorfinkiel N. (2015). Emergent material properties of developing epithelial tissues. *BMC Biol*. **23**:13:98.

Sánchez Ó, Calvo J, Ibáñez C, Guerrero I*, Soler J*. (2015). Modeling Hedgehog Signaling Through Flux-Saturated Mechanisms. *Methods Mol Biol*. **1322**:19-33.

Seijo-Barandiarán I, Guerrero I*, Bischoff M*. (2015). *In Vivo* Imaging of Hedgehog Transport in *Drosophila* Epithelia. *Methods Mol Biol*. **1322**:9-18.

Lindsley DL, Hardy RW, Ripoll P, Lindsley D. (2016). Gonadal Mosaicism Induced by Chemical Treatment of Sperm in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **202**:157-74.

Simon E, Aguirre-Tamaral A, Aguilar G., and Guerrero I. (2016). Perspectives on Intra- and Intercellular Trafficking of Hedgehog for Tissue Patterning. *J. Dev. Biol.* **4**, 34. Review.

Gorfinkiel N. (2016). From actomyosin oscillations to tissue-level deformations. *Dev Dyn*. **245**:268-75. Review.

Jurado J, de Navascués J, Gorfinkiel N. (2016). α -Catenin stabilises Cadherin-Catenin complexes and modulates actomyosin dynamics to allow pulsatile apical contraction. *J Cell Sci*. **129**:4496-4508.

Duque J, Gorfinkiel N. (2016). Integration of actomyosin contraction with cell-cell adhesion during dorsal closure. *Development*. **143**:4676-4686.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Jaime Jurado Gómez. Título: Estudio del papel de α -Catenina y otras proteínas de unión a la Actina en la contracción apical de las células de la Amnioserosa durante el Cierre Dorsal de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Julio, 2016. Director/ Thesis advisor: Nicole Gorfinkiel Haim.

Eleanor Simon. Título: Control of two morphogenetic processes during *Drosophila melanogaster* metamorphosis: Fusion of Imaginal Disc and Ecdysis. Universidad Autónoma de Madrid. Nov, 2016. Director/Thesis advisor: Isabel Guerrero Vega.

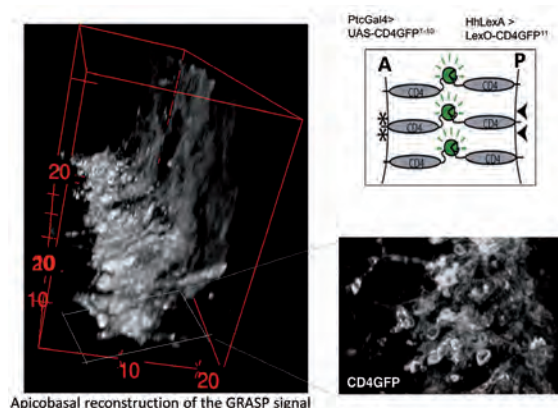


Figura 2. La señal de GRASP (Reconstitución de GFP en parejas sinápticas) entre citonemas del borde de compartimento A/P indica que la recepción de Hh probablemente ocurre como un proceso similar a la sinapsis a lo largo de los citonemas.

Reconstitución 3D de la complementación de GFP (GRASP) entre las células que envían Hh (compartimento A) y las que reciben Hh (compartimento P), mediante la expresión por separado de dos fragmentos de GFP complementarios en cada compartimento del disco imaginal del ala.

Figure 2. The GRASP signal (GFP Reconstitution Across Synaptic Partner) of cytoneme-cytoneme interaction at the A/P compartment border indicates that Hh reception probably occurs as a synaptic-like process along cytonemes.

3D view of a GFP complementation, which was originally developed to image membrane contacts at neuronal synapses, between Hh-sending (A compartment) and Hh-receiving (P compartment) cells by expressing the complementary GFP fragments separately in each cell population of the wing imaginal disc.

Desarrollo Neural en *Drosophila*: especificación de destinos celulares*Drosophila* Neural Development: cell fate specification

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:
José Andrés Álvarez Gómez

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Beatriz Fraile Méndez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Cristina López Roso
Leila Maestro Paramio
Marcos Manzaneque Pradales
Kevin Frances Zaragoza
Andrés Ferreras Gutierrez
Rocio Naranjo Sánchez
Lucía Mendoza Lupiáñez
Andrea Benavente Sánchez

Resumen de investigación

Origen y especificación de los neuroblastos tipo II.

Las células madre neuronales (NSCs) de la materia gris se dividen asimétricamente, autorenovándose y generando células precursoras neuronales (INP) que se dividen varias veces. Saber cómo NSCs controlan sus divisiones es crucial para prevenir la formación de tumores.

En el cerebro embrionario de *Drosophila*, 100 neuroblastos (NBs) por hemisferio generan las neuronas que forman el cerebro larvario. Estos NBs se dividen asimétricamente, autorenovándose y generando otra célula que se divide para dar dos células que se diferencian como neuronas o glía.

En el cerebro de *Drosophila* se ha identificado un grupo de NBs que se dividen de manera diferente, NBs tipo-II (NBs-II), con gran capacidad proliferativa. Los NBs-II se dividen como las NSCs de la corteza de mamíferos, se autorenovan y generan INPs que, después de madurar, se dividen asimétricamente varias veces. Se han identificado varios genes que controlan las divisiones de los NBs-II. Mutaciones en estos genes generan tumores. El estudio de NBs-II permite conocer los mecanismos genéticos que controlan la proliferación de NSCs. Hemos enfocado nuestro trabajo en cómo estos NBs-II se especifican durante la embriogénesis y adquieren la competencia para ser NBs-II.

Mecanismos que controlan la entrada en quiescencia de los neuroblastos.

Las células madre (SCs) pueden autorenovarse, diferenciarse o entrar en quiescencia. El sistema nervioso central (CNS) de *Drosophila* sufre dos neurogénesis: la embrionaria y la larvaria. Un conjunto único de NBs genera ambas neurogénesis, entre ellas, NBs entran en quiescencia. No se conocen los mecanismos que controlan la entrada en quiescencia. Los NBs embrionarios se dividen rápidamente, sin crecimiento celular, por la expresión constitutiva de reguladores del ciclo celular, con ciclos cortos de fases S y mitosis. Por ello sufren una reducción rápida de tamaño. Estudiamos los mecanismos que controlan la entrada en quiescencia de los NBs embrionarios. Nuestra modelo es que la entrada en quiescencia está controlada por una combinación de factores: reducción del tamaño, factores temporales e identidad del NB.

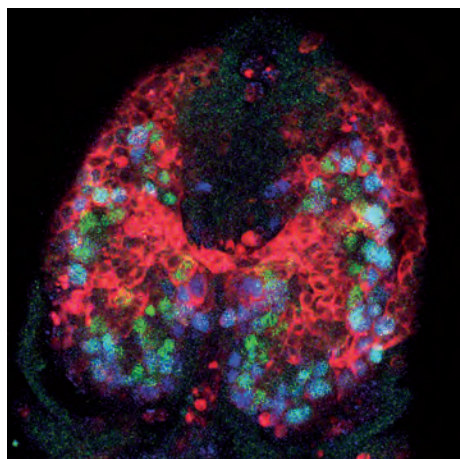


Figura 1. Cerebro de un embrión de *Drosophila* de genotipo *scabrous-GAL4 UAS-mCherry* de estadio 13; se muestra la expresión de *Asense* (verde) y *Deadpan* (azul). En la parte inferior de la figura se pueden observar varios neuroblastos tipo-II (*Deadpan*[+] *Asense*[-]). *Cherry* (red) marca el neuroectodermo. Anterior es arriba.

Figure 1. A *scabrous-GAL4 UAS-mCherry* embryonic brain of stage 13 showing the expression of *Asense* (green) and *Deadpan* (blue). Several type-II neuroblasts (*Deadpan*[+] *Asense*[-]) can be observed at the bottom of the figure. *Cherry* (red) labels the neuroectoderm. Anterior is up.

Research summary

Origin and specification of type-II neuroblasts in the embryonic brain.

Neural stem cells (NSCs) in the mammalian cerebral cortex divide asymmetrically, self-renewing and generating and intermediate neuronal precursor (INP) that will divide a few more times. To know how NSCs control their divisions is crucial to prevent the formation of tumors.

In the *Drosophila* embryonic brain a set of 100 neuroblasts (NBs) per hemisphere give rise to the entire set of larval brain neurons. These NBs divide asymmetrically, self-renewing and generating another cell that will divide once to create two cells that will differentiate as neurons or glial cells.

A small set of NBs divides differently, type-II NBs (NB-II). NBs-II divide as the NSCs of the mammalian cortex, self-renewing and generating an INP that, after maturation, will divide asymmetrically about five more time. Several genes that control NB-II cell divisions have been identified. Mutant alleles of these genes generate brain tumors. The study of NBs-II offers a good opportunity to know the genetic mechanisms that control NSC division.

We have focused our work in the mechanisms by which these NBs are specified during embryogenesis and how they acquire the competence to be NBs-II.

Mechanisms that control the entry into quiescence of embryonic neuroblasts.

Stem cells (SCs) can either self-renew, differentiate or enter quiescence. Understanding how SCs switch between these states is highly relevant.

Drosophila central nervous system (CNS) undergoes two neurogenesis: the embryonic and the larval neurogenesis. A unique set of embryonic NBs gives rise to both neurogenesis. Between them, NBs exit cell cycle and enter quiescence. Very little is known about the mechanisms that control the entry into quiescence of NBs.

Embryonic NBs divide very rapidly. This is due to the constitutive expression of the cell cycle regulators, which produce short cycles of continuous S phases and mitosis. These NBs have blocked cell growth, thus, these NBs undergo a rapid and progressive reduction in cell size.

We intend to study the mechanisms that control the entry into quiescence of embryonic NBs. Our working hypothesis is that the entry into quiescence is controlled by a combination of three factors: the reduction in size, the temporal factors, and the identity of the NB.

Publicaciones / Publications

Moris-Sanz, M., Estacio-Gomez, A., Sánchez-Herrero, E. and Díaz-Benjumea, F. J. (2015) The study of the Bithorax-complex genes in patterning CCAP neurons reveals a temporal control of neuronal differentiation by Abd-B. *Biology Open* 4:1132-1142.

Álvarez-Rivero, J., Moris-Sanz, M., Estacio-Gomez, A., Montoliu-Nerin, M., Díaz-Benjumea, F. J. and Herrero, P. (2016) Variability in the number of abdominal leucokineric neurons in adult *Drosophila* melanogaster. *Journal of Comparative Neurology* 525:639-660.

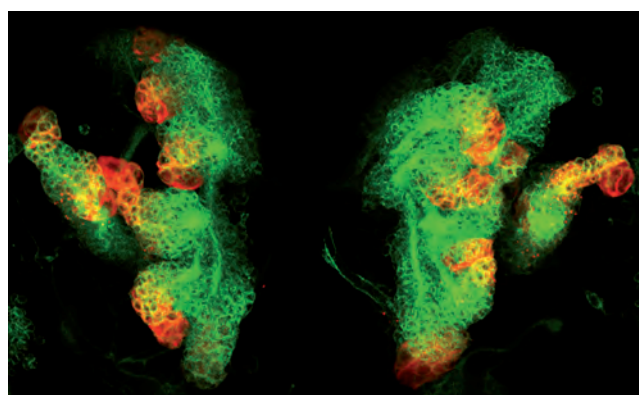


Figura 2. Inmortalización del linaje de los neuroblastos tipo-II observados en un cerebro de tercer estadio larvario. Rojo: *wor-Gal4 ase-Gal80 UAS-mCherry*; Verde: *Act5>nlsLexAp5>LexAop-myr::GFP*. Anterior es arriba.

Figure 2. Immortalization of type-II neuroblast lineages observed in a third-instar larval brain. Red: *wor-Gal4 ase-Gal80 UAS-mCherry*; Green: *Act5>nlsLexAp5>LexAop-myr::GFP*. Anterior is up.

Laboratorio de polaridad epitelial

Epithelial polarity laboratory

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

Postdoctorales/ *Postdoctoral Fellows:*
Ilenia Bernascone

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Sergio Gómez
María Delgado Barea-Santisteban
Mariam Hachimi
Mireva Boch

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Arantxa Sainz Bautista
Tamara González

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Silvia Campanario
Claudia Carabaña García

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 de células epiteliales en tres dimensiones en formato de micropatrones “organ-on-a-chip”. Los sistemas celulares epiteliales organotípicos se están convirtiendo en uno de los mejores modelos *in vitro* para la investigación a nivel molecular de la morfogénesis epitelial. Es más, con este sistema estamos obteniendo información esencial sobre los mecanismos moleculares que regulan la morfogénesis epitelial. 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* debe servir para validar y caracterizar mejor los fenotipos observados *in vitro*. Como modelos *in vivo*, empleamos el intestino de pez cebra y de ratón. Asimismo, hemos iniciado una nueva vía de investigación centrada en el estudio de la formación de la red epitelial en la glándula mamaria de ratón.

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 tres aspectos esenciales de este proceso:

- Caracterización de vías de señalización para la diferenciación epitelial
- Análisis de la mecánica celular que controla la formación del lumen en células epiteliales
- Procesos de orientación del huso mitótico en el crecimiento y organización epitelial.

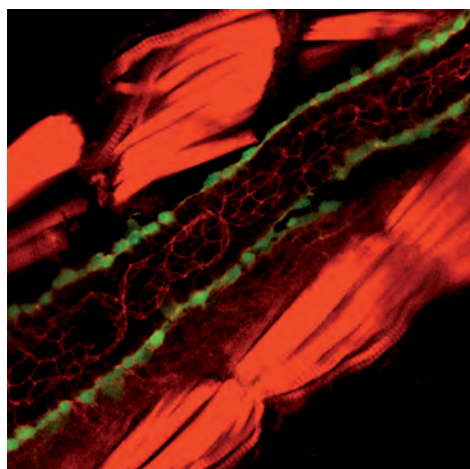


Figura 1. Morfogénesis epitelial en el intestino de pez cebra. Se muestra una sección transversal de un intestino larvario de 3 días después de la fertilización teñido para visualizar F-actina (rojo), y Patch-GFP (verde).

Figure 1. Epithelial morphogenesis in the zebrafish intestine. A transverse gut section of a 3-day post-fertilization larva is shown after co-staining to visualize F-actin (red) and Patch-GFP (green).

Research summary

My main scientific interest is the understanding of epithelial morphogenesis and polarity during development and regeneration, as well as their implications in human diseases, such as cancer. Our research is based on the organotypic culture model of three-dimensional epithelial cells in micropatterns "organ-on-a-chip", which are becoming one of the best in vitro models systems for the investigation of epithelial morphogenesis. Moreover, with this system we are obtaining essential information about the molecular mechanisms that regulate epithelial morphogenesis. However, this model cannot reconstitute the complexity of the architecture given in vivo, which includes different cell types, dynamic remodeling and tissue homeostasis. For this reason, the use of in vivo systems should serve to validate and better characterize the phenotypes observed in vitro. We used the zebrafish and mouse intestine as model systems to elucidate epithelial morphogenesis. We have also initiated a new research line focused on the study of epithelial tubulogenesis in the mouse mammary gland.

I am focused on the analysis of genes that regulate epithelial polarity and membrane dynamics in lumen formation, and particularly on three essential aspects: membrane trafficking, mechanical forces and spindle orientation. In particular, my lab is focused in:

- Characterization of signaling pathways for epithelial differentiation and patterning
- Analysis of cellular mechanics controlling lumen formation in epithelial cells
- Spindle orientation processes in epithelial growth and organization

Publicaciones / Publications

Ilenia Bernascone, Hachimi, M and Martin-Belmonte, F (2016) Signaling networks in epithelial tube formation. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol* pii: a027946.

Vidal-Quadras M, Holst MR, Francis MK, Larsson E, Hachimi M, Yau WL, Peränen J, Martín-Belmonte F, Lundmark R. (2016) Endocytic turnover of Rab8 controls cell polarization. *J Cell Sci*. pii: jcs.195420.

Pablo Luján, Giulia Varsano, Teresa Rubio, Marco L. Hennrich, Timo Sachsenheimer, Manuel Gálvez-Santisteban, Martín-Belmonte, F Anne-Claude Gavin, Britta Brügger, Maja Köhn. (2016) Phosphatase of regenerating liver (PRL)-3 disrupts epithelial architecture by altering the post-mitotic midbody position. *J Cell Sci*.

Xia J; Swiercz J; Banon-Rodriguez I; Matković I; Federico G; Sun T; Franz T; Brakebusch C; Kumanogoh A; Friedel RH; Martín-Belmonte F, Gröne H; Offermanns S; Worzfeld T. (2015) Semaphorin-Plexin Signaling Controls Mitotic Spindle Orientation during Epithelial Morphogenesis and Repair. *Dev Cell*, **33**: 299-313.

Rodríguez-Fraticelli AE; Bagwell, J; Bosch, M; Reglero, N; Borreguero, A Alonso, MA; Millan, J; Perez, F; Bagnat, M and Martín-Belmonte, F. (2015) Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nature Cell Biol* **17**:241-50.

Otras actividades / Other activities

Incorporación plaza de Investigador Científico CSIC por Concurso oposición en Mayo de 2015.

2015 Adjunto de la ANEP (BFS) en Biología Celular.

Invited speaker in international meetings.

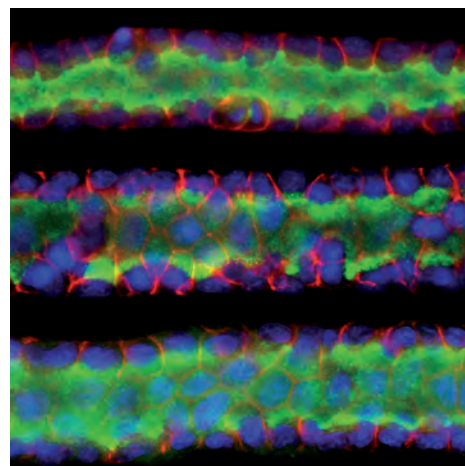
-*Building the Cell (BTC) Research Conference*. September 28-30th, 2016. Institute Pasteur, Paris.

-*Gordon Research Conference 2016*—Cell Polarity Signaling. June 11-17th, 2016. Mt Snow Resort, West Dover, VT.

-*Beatson International Cancer Conference* —Control of Cell polarity and movement in Cancer. July 5-8th, 2015. Glasgow, Scotland, UK.

Figura 2. Morfogénesis epitelial en micropatrones. Imagen de confocal de células MDCK crecidas en un sistema de micropatrones para formar tubos epiteliales 3D del tipo "organ-on-a-chip". Se muestra una imagen central de los tubos epiteliales teñidos con actina (verde), e-caderina (rojo), y núcleos/DNA (azul)

Figure 2. Epithelial morphogenesis in micropatterns. Confocal image of MDCK cells grown in a micropattern system to form "organ-on-a-chip" 3D epithelial tubes. A central image of the epithelial tubes stained with actin (green), e-caderin (red), and nuclei /DNA (blue) is shown.



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
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 M^a González Herrera

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Izarne Medina Azpiazu

Resumen de investigación

Durante el periodo 2015-2016, el laboratorio ha estado involucrado en dos líneas de investigación: 1) El estudio de mutaciones oncogénicas en *Drosophila*, en particular en relación con los fenómenos de apoptosis y competición celular, y 2) análisis experimental de la regeneración en los discos imaginales.

Con respecto al tema de la tumorigénesis, hemos caracterizado las propiedades oncogénicas de células mutantes para lethal giant larvae (lgl) (Calleja et al 2016). Estas células muestran características de células tumorales de mamíferos: proliferación indefinida, traqueogénesis (equivalente en insectos de vasculogénesis) y capacidad invasiva. Muestran también altos niveles de apoptosis lo que conduce a sobre-activación de la vía Jun-N-Terminal Kinase (JNK). La función de JNK es un factor principal en la tumorigénesis de las células lgl: induce su proliferación y les confiere capacidad invasiva. Estamos estudiando la relación de JNK con otras mutaciones oncogénicas. Debido a la identificación de JNK como factor tumorigénico, estamos estudiando sus características funcionales. Hemos observado que posee un mecanismo de auto-mantenimiento: después de un fenómeno transitorio de activación (irradiación o pulso corto de p53) JNK queda activo de forma permanente, lo que genera una situación oncogénica. El papel de JNK en relación con competición celular y apoptosis se discute en una revisión reciente (Morata y Ballesteros-Arias 2015)

La segunda línea de investigación es el estudio de los procesos regenerativos en los discos imaginales. El foco principal ha sido la comparación entre la capacidad regenerativa del tronco y los apéndices; se sabe mucho de regeneración en los apéndices pero muy poco del tronco. El disco de ala es un órgano conveniente para estudiar este problema debido a que contiene un componente de tronco – el notum - y el apéndice ala. Encontramos que, al contrario de ala, el notum prácticamente no regenera. Además, encontramos que el notum y el ala no se pueden reprogramar para formar una u otra durante los procesos regenerativos. Hemos mostrado también que la respuesta proliferativa durante regeneración está mediada por señalización JNK proveniente de las células en apoptosis pero JNK funciona de forma diferente en el tronco y en los apéndices. Los mecanismos celulares y moleculares de reprogramación durante regeneración se discuten en una revisión reciente (Morata and Herrera 2016).

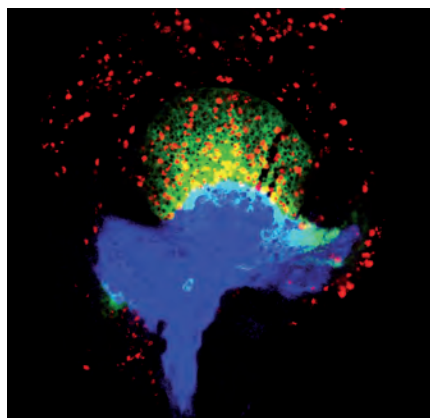


Figura 1. Disco imaginal de ala de *Drosophila* en el que la supresión de división celular en el compartimento dorsal (en azul) conduce a un incremento de proliferación celular en forma de gradiente en el compartimento ventral (parte superior). Los valores mas altos de proliferación corresponden al borde dorso/ventral. Las células en división aparecen marcadas en rojo por la tinción Edu.

Figure 1. Wing imaginal disc in which suppression of cell division in the dorsal compartment (in blue) leads to an increase of cell proliferation in the ventral compartment (upper part). The higher proliferation levels correspond to the proximity of the dorso/ventral compartment border. Cells in division are labelled red with Edu.

Research summary

During the 2015-2016 period the group has focussed on two major research lines: 1) The study of oncogenic mutations and in particular in relation to the phenomena of cell competition and apoptosis, and 2) experimental analysis of regeneration in the imaginal discs.

Regarding the issue of tumorigenesis we have analysed the oncogenic properties of cells mutant for the gene *lethal giant larvae* (*lgl*) (Calleja et al 2016). Those cells display characteristic features of mammalian tumour cells: they may proliferate indefinitely, induce additional tracheogenesis (an insect counterpart of vasculogenesis) and invade neighbouring tissues. The mutant tissues exhibit high apoptotic levels, which lead to the over-expression of the Jun-N-Terminal Kinase (JNK) pathway. JNK appears to be a key factor in the acquisition of tumorigenic properties by *lgl* cells; it promotes cell proliferation and confers tumour cells capacity to invade wild-type tissue. The link of JNK with other oncogenic mutations is also under study. Because of the identification of JNK as a major tumorigenic factor, we are actively investigating JNK function. We find that JNK is able to sustain its own function; after a short activation event (X-radiation or a brief pulse of p53) it may become permanently active, thus generating a tumorigenic situation. The role of the JNK pathway in relation with tumorigenesis and cell competition has been discussed in a recent review (Morata and Ballesteros-Arias 2015)

The second research line has been the analysis of regeneration in the imaginal discs. A principal focus has been the comparison of the regeneration potential of the trunk and appendages; much is known about regeneration of the appendages, but virtually nothing about the trunk. The wing disc is a convenient system to address this issue because it contains a trunk component, the notum, and a wing appendage. We find that in contrast with the strong regenerative response of the wing, the notum does not regenerate. Our experiments also indicate that the trunk and the appendage are developmentally isolated structures that cannot be reprogrammed to generate each other. We also show that the proliferative response during regeneration is mediated by JNK signalling emanating from dying cells, but JNK function appears to be different in trunk and in appendages. The cellular and molecular mechanisms of reprogramming during regeneration are discussed in a recent review (Morata and Herrera 2016)

Publicaciones / Publications

Morata, G. and Ballesteros-Arias, L. (2015) "Cell competition, apoptosis and tumour development" *Int. J. Dev. Biol.* **59**, 79-86.

Morata G. and Herrera, S.C. (2016) "Cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*: transgression of compartment boundaries" *Current Opinion in Genetics & Development* **40**, 11-16.

Calleja, M., Morata, G. and Casanova, J. (2016) "The tumorigenic properties of *Drosophila* epithelial cells mutant for *lethal giant larvae*". *Dev. Dynamics* **245**, 834-843.

Premios / Awards

Premio Nacional de Genética 2015- Modalidad Básica
Science Award (shared with P.A. Lawrence). Centenary Awards of the British Spanish Society 1916-2016.

Organización de congreso en Madrid

"Cell competition, Apoptosis and Cancer" Fundación Ramón Areces
Madrid 25-26 October 2016.

Tesis doctorales / Doctoral theses

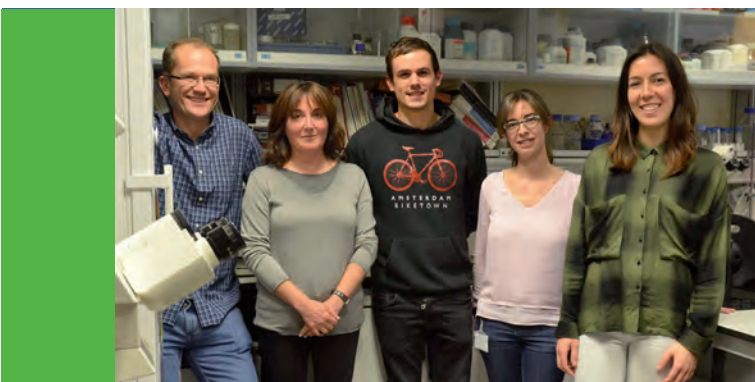
Luna Laura Ballesteros Arias (2016). "The role of cell competition in tumour initiation and progression in *Drosophila melanogaster*". Universidad Autónoma de Madrid. Ginés Morata.

María Martín Montero (2016). "La apoptosis como factor promotor de tumorigenesis en *Drosophila melanogaster*". Universidad Autónoma de Madrid. Ginés Morata.

Antonio José Montes Ruiz (2016). "Control del crecimiento en los discos imaginarios de *Drosophila melanogaster*". Universidad Autónoma de Madrid. Ginés Morata.

Genética del desarrollo de derivados mesodérmicos en *Drosophila*: sistemas muscular y excretor

Developmental biology of mesoderm derivatives: muscular and excretory systems



Jefe de Línea / Group Leader:
Mar Ruiz Gómez

Personal Científico /
Scientific Staff:
Joaquim Culi Espigul
(Desde enero 2016)

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Marta Carrasco Rando

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Alexandra Atienza Manuel

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:

Nuria Esteban Delgado
(Hasta abril 2016)
Roberto Menchén de Ochoa
(Desde marzo 2016)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Raquel Barbero Jiménez
Irene Varela Martínez

Resumen de investigación

Durante este bienio nuestro grupo ha completado un periodo de transición en su actividad investigadora. Así, al finalizar este periodo, hemos cerrado la línea de investigación dedicada al estudio de la regulación de la miogénesis en *Drosophila* y hemos redirigido nuestro esfuerzo al análisis de la formación y dinamismo del diafragma de filtración renal y de sus alteraciones en condiciones patológicas. En nuestros estudios utilizamos dos organismos modelos, *Drosophila melanogaster* y el pez cebra *Danio rerio*, y ponemos el énfasis en las posibles implicaciones médicas que puedan derivar de nuestra investigación. El diafragma de filtración renal es una unión celular modificada que actúa como un filtro molecular durante el proceso de ultrafiltración del plasma sanguíneo y representa la diana principal sobre la que actúan los agentes implicados en el desarrollo de nefropatías. Recientemente demostramos que los principales constituyentes moleculares del diafragma de filtración, los mecanismos implicados en su formación y estabilidad, así como los que derivan en daño y su reparación, están altamente conservados entre vertebrados y *Drosophila*, validando el uso de este organismo modelo para estudiar aspectos de la biología y la patología del diafragma de filtración renal. Nuestra aproximación consiste en utilizar las ventajas y versatilidad de las técnicas genéticas de *Drosophila* para identificar nuevos componentes y reguladores del diafragma de filtración que pudieran utilizarse como dianas terapéuticas. Así, un rastreo de genes candidatos -basado en su atenuación mediante RNA interferente- nos ha permitido seleccionar una treintena de ellos para su caracterización funcional actualmente en curso. Una vez que estos genes son validados en *Drosophila*, utilizamos el pez cebra para comprobar si su función está conservada en vertebrados como una primera aproximación para evaluar su potencial terapéutico.

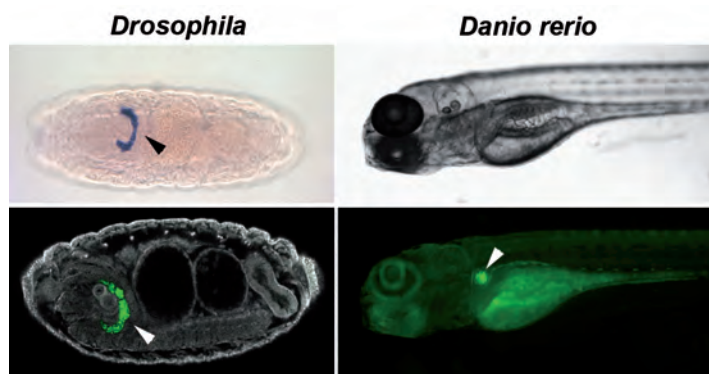


Figura 1. Las células del sistema excretor implicadas en el proceso de ultrafiltración poseen diafragmas de filtración y se identifican por la expresión de genes específicos, como son *podocin* en los podocitos del pez cebra y *cubilin-like* en los nefrocitos de *Drosophila*.

Figure 1. The cells of the excretory system involved in the process of ultrafiltration have filtration/slit diaphragms and can be identified by the expression of specific genes such as *podocin* in zebrafish podocytes and *cubilin-like* in *Drosophila* nephrocytes.

Research summary

During the past two years, our team has completed a transition in our research activity. Thus, we finalised a project aimed to study myogenesis regulation in *Drosophila* and redirected our research efforts towards the investigation of filtration/slit diaphragm formation and dynamics in normal and pathological conditions.

To reach that goal we use two well-suited model systems: *Drosophila melanogaster* and the zebrafish *Danio rerio*, emphasising on the possible medical applications of our research. The filtration/slit diaphragm is a modified cell junction that works as a molecular filter during the process of blood ultrafiltration, and is the main target of injury for agents that trigger nephropathies. Recent work from our group established that the principal molecular components of the filtration/slit diaphragm, the mechanisms involved in its formation and stability and those resulting in damage and repair, are conserved between vertebrates and flies, thus validating the use of our animal models to study aspects of the biology and pathology of the renal slit diaphragm. Hence, our experimental approach takes advantage of the great versatility of *Drosophila* genetic techniques to identify novel components and regulators of the filtration/slit diaphragm that could serve as therapeutic targets. Thus, an RNAi based candidate-gene screen in *Drosophila* has identified about thirty novel putative components and regulators of the filtration/slit diaphragm protein-complex. We are currently undertaking the functional characterisation of these candidates. Once validated in flies, we use the zebrafish model to examine their role in vertebrates as a first step to evaluate their therapeutic potential.

Publicaciones / Publications

Carrasco-Rando, M., Atienza-Manuel, A., Tutor, A. S. and Ruiz-Gómez, M. (2015) Modelling renal development and disease in *Drosophila*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, pp 1-8.

Carrasco-Rando, M., Atienza-Manuel, A., Martín, P., Burke, R. and Ruiz-Gómez, M. (2016) Fear-of-intimacy-mediated zinc transport controls the function of zinc-finger transcription factors involved in myogenesis. *Development* **143**, 1948-1957.

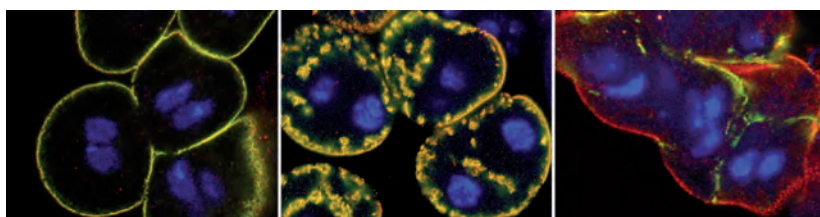


Figura 2. Localización de los componentes del diafragma de filtración Duf (verde) y Pyd (rojo) en nefrocitos silvestres (izquierda) y en dos mutantes identificados en el laboratorio que afectan a la endocitosis (centro) y a la composición fosfolipídica de la membrana plasmática (derecha). Núcleos en azul.

Figure 2. Localisation of the filtration/slit diaphragm components Duf (green) and Pyd (red) in wildtype nephrocytes (left) and in two mutants identified in the laboratory affecting endocytosis (centre) and the phospholipid composition of the plasma membrane (right). Nuclei visualised in blue.

Especificación segmental y formación de patrón en *Drosophila**Segmental specification and pattern formation in Drosophila*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Alicia Gonzalo Gómez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Celia González Cortés
Delia del Saz Soler
Rafael Alejandro Juárez Uribe
Nuria Prieto Hueso
Jesús Rodríguez Curt

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Paloma Martín Fernández

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Francisco Javier Llorente

Resumen de investigación

En nuestra investigación estudiamos la función de los genes Hox en distintos aspectos del desarrollo de *Drosophila*. En los últimos años hemos continuado con el análisis de los mecanismos que regulan la eliminación del segmento séptimo abdominal de los machos durante la pupación. El proceso depende primeramente de la actividad del gen Hox Abdominal-B (Abd-B) y de la vía de determinación sexual y requiere la actividad de la vía de señalización del Epidermal growth factor receptor y la falta de actividad de la vía de Wingless/Wnt. También se necesita la actividad del gene extramacrochetae (emc), que codifica una proteína HLH, que se requiere para inhibir la función de otra proteína HLH, Daughterless. La eliminación del segmento tiene lugar por un proceso de extrusión celular que quizás requiera muerte celular previa. Hemos observado igualmente que la eliminación de las células larvianas del segmento inmediatamente posterior, el octavo abdominal, parece estar funcionalmente ligada con la rotación de la placa genital que tiene lugar en el mismo momento del desarrollo. La falta de eliminación de estas células impide la correcta rotación de la genitalia y analia.

También hemos estudiado los mecanismos que determinan el crecimiento del segmento A9 en el disco genital de hembra de *Drosophila* y su regulación por la vía de determinación sexual, el gen Hox Abdominal-B y los cofactores de proteínas Hox Extradenticle y Homothorax. Estos elementos reprimen la expresión del gen decapentaplegic, que codifica para una proteína que estimula crecimiento. De esta forma se restringe el crecimiento de este segmento. Las proteínas Abd-B, Double sex Female (que confiere identidad sexual de hembra), Extradenticle y Homothorax podrían formar un complejo proteico que reprimiría la expresión de decapentaplegic en este segmento y limitaría así su crecimiento.

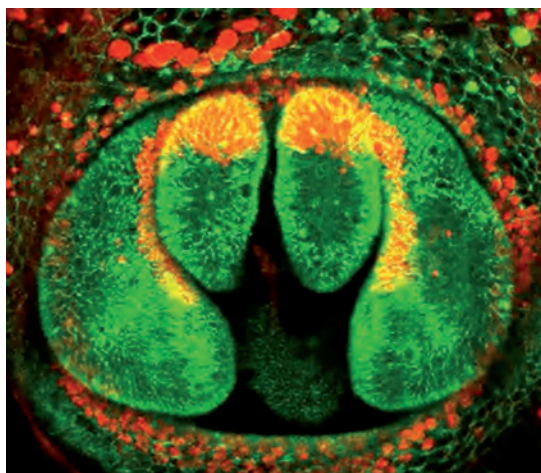


Figura 1. Genitalia de un macho de *Drosophila* rodeada por células del abdomen posterior. Las membranas celulares están marcadas en verde con nrg-GFP y los compartimentos posteriores de la analia, genitalia y abdomen posterior en rojo con hh-DsRed.

Figure 1. Genitalia of a *Drosophila* male surrounded by cells of the posterior abdomen. Cell membranes are marked in green with nrg-GFP and the posterior compartments of analia, genitalia and posterior abdomen in red with hh-DsRed.

Research summary

In our research we studied the role of Hox genes in different aspects of *Drosophila* development. In the last years we have continued with the analysis of the mechanisms that regulate the elimination of the seventh abdominal segment of the males during pupation. The process primarily depends on the activity of the Hox gene Abdominal-B (Abd-B) and the sexual determination pathway, and requires the activity of the Epidermal growth factor receptor signaling pathway and the lack of activity of the Wingless / Wnt pathway. The activity of the extramacrochetae gene (*emc*), which encodes an HLH protein, is also required, and it is needed to inhibit the function of another HLH protein, Daughterless. Removal of the segment takes place through a cellular extrusion process that may require prior cell death. We have also observed that the elimination of the larval cells of the immediately posterior segment, the eighth abdominal one, seems to be functionally linked with the rotation of the genital plate that takes place at the same moment of development. The lack of elimination of these cells prevents the correct rotation of genitalia and analia.

We have also studied the mechanisms that determine the growth of segment A9 in the female genital disc of *Drosophila* and its regulation by the sexual determination pathway, the Hox gene Abdominal-B and the cofactors of Hox proteins Extradenticle and Homothorax. These elements repress the expression of the decapentaplegic gene, which codes for a growth-promoting protein. The proteins Abd-B, Double sex Female (which confers female sexual identity), Extradenticle and Homothorax could form a protein complex that would suppress the expression of decapentaplegic in this segment and thus limit its growth.

Publicaciones / Publications

Moris-Sanz, M., Estacio-Gómez, A., Sánchez-Herrero, E., and Díaz-Benjumea, F.J. (2015). The study of the Bithorax-complex genes in patterning CCAP neurons reveals a temporal control of neuronal differentiation by Abd-B. *Biology Open* 4, 1132-1142.

Foronda, D., Curt, J.R., Prieto, N., Martin, P. and Sánchez-Herrero, E. (2015). The elimination of an adult segment by the Hox gene Abdominal-B. *Mechanisms of Development* 138, 210-217.

Sing, S., Sánchez-Herrero, E. and Shashidhara, L.S. (2015). Critical role for Fat/Hippo and IIS/Akt pathways downstream of Ultrabithorax during haltere specification in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 138, 198-209.

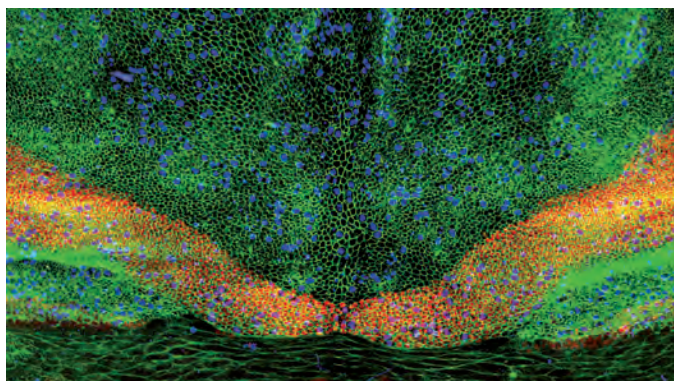
Castelli-Gair Hombría, J., Sánchez-Higueras, C. and Sánchez-Herrero, E. (2016). Control of Organogenesis by Hox Genes. In: "Organogenetic Gene Networks. Genetic Control of Organ Formation" (Castelli-Gair Hombría and Paola Bovolenta, eds), pp.319-375. Springer.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Jesús Rodríguez Curt (2015). "Análisis funcional de la proteína Abdominal-B y de los genes extradenticle y homothorax en *Drosophila melanogaster*". Director: Ernesto Sánchez-Herrero.

Figura 2. Tórax pupal de *Drosophila* en el que las membranas de las células se marcan en verde con *nrg-GFP*, el compartimento posterior del mesotórax en rojo con *hh-DsRed* y los núcleos en azul, marcados con anti-Ph3, indican células en mitosis.

Figure 2. *Drosophila* pupal thorax in which cell membranes are marked in green with *nrg-GFP*, posterior mesothorax compartment in red with *hh-DsRed* and the nuclei in blue, marked with anti-Ph3, indicate cells undergoing mitosis.





14 Grupos / 14 Groups

- | | |
|---|--|
| 120 CARMEN ARAGÓN RUEDA | Fisiopatología de los transportadores de glicina en la neurotransmisión glicinérgica: hiperplexia y dolor
<i>Physiopathology of glycine transporters in glycinergic neurotransmission: hyperekplexia and pain</i> |
| 122 JESÚS ÁVILA DE GRADO | Función de las proteínas microtubulares en neuronas
<i>Function of microtubular proteins in neurons</i> |
| 124 MARÍA JESÚS BULLIDO | Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer: Estudio genómico de modelos celulares patogénicos
<i>Genetic bases of Alzheimer's disease: Genomic study of pathogenic cell models</i> |
| 126 JAVIER DÍAZ-NIDO | Fisiopatología y terapia de las enfermedades neurodegenerativas: Ataxia de Friedreich
<i>Physiopathology and therapy of neurodegenerative diseases: Friedreich's Ataxia</i> |
| 128 FCO. JAVIER DÍEZ GUERRA | Bases Moleculares de la Plasticidad Neuronal
<i>Molecular Bases of Neuronal Plasticity</i> |
| 130 CARLOS DOTTI | Laboratorio de diferenciación y envejecimiento neuronal
<i>Neuronal differentiation and brain aging</i> |
| 132 JOSÉ ANTONIO ESTEBAN GARCÍA | Mecanismos de plasticidad sináptica y contribución a la función cognitiva
<i>Mechanisms of synaptic plasticity, and contribution to cognitive function</i> |
| 134 CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN / FRANCISCO ZAFRA | Bases moleculares de las sinapsis glutamatérgicas
<i>Molecular bases of glutamatergic synapses</i> |



Neuropatología Molecular

Molecular Neuropathology

- | | | |
|------------|--|--|
| 136 | MARÍA DOLORES LEDESMA MUÑOZ | Lípidos en la fisiología y patología neuronal
<i>Lipids in neuronal physiology and pathology</i> |
| 138 | JOSÉ JAVIER LUCAS LOZANO | Enfermedad de Huntington y otras enfermedades del sistema nervioso central
<i>Huntington's disease and other CNS disorders</i> |
| 140 | ALBERTO MARTÍNEZ SERRANO | Biología de células troncales neurales humanas. Potencial para reposición celular y terapia génica en neurodegeneración
<i>Biology of human neural stem cells. Potential for cell and gene therapy in neurodegeneration</i> |
| 142 | LOURDES RUIZ DESVIAT | Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias e investigación en nuevas terapias
<i>Molecular basis of inherited metabolic diseases and research in novel therapies</i> |
| 144 | JORGINA SATRÚSTEGUI GIL-DELGADO | Señalización mitocondrial del calcio y señalización de insulina/leptina en envejecimiento
<i>Calcium signalling in mitochondria and insulin/leptin signalling during ageing</i> |
| 146 | FRANCISCO WANDOSELL JURADO | Mecanismos moleculares de neurogeneración
<i>Molecular mechanisms of neurodegeneration</i> |

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

Jefe de Línea Asociado /
Associated Group Leader:
Beatriz López-Corcuera
(Desde 4 abril 2015)

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
David Bartolomé Martín

Predoctorales / *Predocctoral Fellows:*
Esther Arribas González
Lucía Villarejo López
(Hasta 31 de marzo de 2016)
Andrés de la Rocha Muñoz
Cristina Benito Muñoz

Técnico de investigación /
Technical Assistance:

Enrique Núñez Balbuena

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Raquel de Felipe Mendía
Laura Barreiro Fernández

Resumen de investigación

Nuestro grupo estudia la estructura, función y regulación de los transportadores de glicina, GlyT1 y GlyT2 con especial orientación hacia las patologías humanas en que estas proteínas, que finalizan la neurotransmisión glicinérgica, están implicadas: hiperplexia y dolor. Algunas mutaciones en el gen humano de GlyT2 (SLC6A5) producen hiperplexia por deficiente reciclado de la glicina sináptica. Hemos analizado los mecanismos patogénicos de una mutación dominante-negativa encontrada en pacientes de hiperplexia que altera el tráfico intracelular de GlyT2 y bloquea su expresión en superficie. Encontramos que el mutante se pliega defectuosamente y solo produce transportador inmaduro retenido en el retículo endoplásmico. Mediante mutagénesis múltiple y estudio de la sensibilidad a endoglicosidasas hallamos la causa del plegamiento aberrante y su patrón de glicosilación. El mutante es sustrato preferido para la chaperona calnexina y tiene una interacción defectuosa con la proteína Sec24D necesaria para la salida del retículo. Por ello, retiene al fenotipo silvestre en el retículo endoplásmico mediante formación de heterómeros de mayor estabilidad que los homómeros de GlyT2. Primera demostración funcional de la estructura cuaternaria de GlyT2. La retención puede rescatarse mediante sobreexpresión de la chaperona calnexina. Por analogía, otras chaperonas farmacológicas como el 4-fenil butirato (PBA), compuesto aprobado por la FDA y que atraviesa la barrera hematoencefálica, pueden restaurar tanto la expresión en membrana como el transporte de glicina del GlyT2 activo co-expresado con el mutante en células heterólogas y neuronas primarias corticales. Este trabajo, permitirá estudiar farmacofonas específicas en este y otros mutantes para acercarnos a la terapia de la hiperplexia.

Nuestro grupo estudia también aspectos estructurales de los GlyTs utilizando herramientas bioinformáticas para conocer sitios de anclaje de inhibidores o la interfase de oligomerización, así como su interactoma. La regulación de GlyTs por receptores implicados en el procesamiento de la señal dolorosa en la médula espinal es también prioritaria.

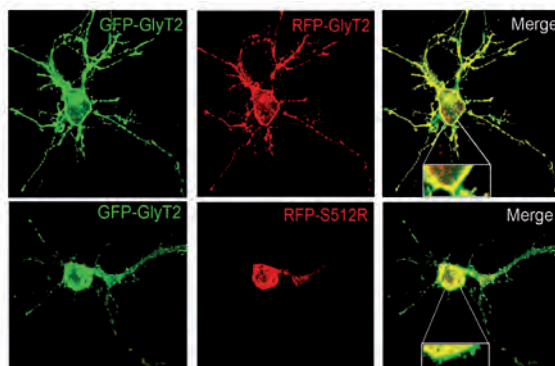


Figura 1. Co-expresión de GlyT2 (GFP-GlyT2) con el mutante dominante-negativo de hiperplexia (RFP-S512R) en neuronas primarias reduce la expresión en superficie del fenotipo silvestre.

Figure 1. Co-expression of GlyT2 (GFP-GlyT2) with the dominant-negative hyperekplexia mutant (RFP-S512R) in primary neurons showing the reduced plasma membrane expression of the wild type.

Research summary

Our group studies the structure, function and regulation of the glycine transporters, GlyT1 and GlyT2, with special orientation towards human pathologies in which these proteins, which end the glycinergic neurotransmission, are involved: hyperekplexia and pain. Some mutations in the human GlyT2 gene (SLC6A5) produce hyperekplexia by deficient recycling of synaptic glycine.

We have analyzed the pathogenic mechanisms of a dominant-negative mutation found in hyperekplexia patients that disrupts the intracellular traffic of GlyT2 and blocks its surface expression. We found that the mutant folds defectively and only produces immature transporter retained in the endoplasmic reticulum. Through multiple mutagenesis and study of the sensitivity to endoglycosidases we find the cause of the aberrant folding and its pattern of glycosylation. The mutant is a preferred substrate for the chaperone calnexin and has a defective interaction with the Sec24D protein required for the exit from the endoplasmic reticulum. Therefore, it retains the wild-type transporter in the endoplasmic reticulum by forming heteromers of greater stability than the GlyT2 homomers. This is the first functional demonstration of the quaternary structure of GlyT2. The retention can be rescued by overexpression of the chaperone calnexin. By analogy, other pharmacological chaperones such as the FDA-approved compound 4-phenyl butyrate (PBA), which crosses the blood brain barrier, can restore both membrane expression and glycine transport of the active GlyT2 co-expressed with the mutant in heterologous cells and primary cortical neurons. This work, will allow studying specific pharmacophores in this and other mutants to find therapeutic tools for the hyperekplexia.

Our group also studies structural aspects of GlyTs using bioinformatics tools to find sites for docking inhibitors or the oligomerization interface, as well as regulation by receptors involved in the processing of the pain signal in the spinal cord.

Publicaciones / Publications

Jimenez E, Nuñez E, Ibañez I, Zafra F, Aragon C*, Gimenez C*. (2015) Glycine Transporters GlyT1 and GlyT2 are Differentially Modulated by Glycogen Synthase Kinase 3β. *Neuropharmacology* **89**:245-254. *shared last authorship.

Arribas-González, E., de Juan Sanz, J., Aragón C. and López-Corcuera, B. (2015) Molecular basis of the dominant-negative effect of a GlyT2 mutation associated with hyperekplexia. *J Biol Chem.* **290**(4):2150-65.

Otras actividades / Other activities

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.

Miembro del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER, grupo U751) del Instituto de Salud Carlos III.

The group belongs to the Institute of Investigación Biosanitaria IdiPAZ from November 2010 as research group "Implication of glycinergic and glutamatergic systems in pathologies of the Central Nervous System".

Función de las proteínas microtubulares en neuronas

Function of microtubular proteins in neurons



Jefe de Línea / *Group Leader*:
Jesús Ávila de Grado

Jefe de Línea Asociado /
Associated Group Leader:
Félix Hernández Pérez

Personal Científico / *Scientific Staff*:
Laura Sayas Casanova
María Llorens Martín
Vega García Escudero
Marta Bolós Jurado

Postdoctorales / *Postdoctoral Fellows*:
Alberto Gómez Ramos
Jerónimo Jurado Arjona
Noemí Pallas Bazarra

Patricia Martí-Maestro
Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Jesús Merchán Rubira
Juan Ramón Perea
Alberto García Rodríguez
Julia Terreros Roncal

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Raquel Cuadros Catalán
Esther García García
Nuria de la Torre Alonso

Resumen de investigación

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos estructuras aberrantes, las placas seniles (formadas por el péptido beta amiloide) y los ovillos neurofibrilares (compuestos por la proteína tau). Una hipótesis prevalente es que el péptido beta amiloide inicia el efecto tóxico y que la proteína tau (modificada) lo ejecuta. Esta hipótesis se basa en el hecho de que mientras el péptido amiloide está tanto en células nerviosas como en periféricas, la proteína tau está preferentemente en neuronas que son las células dañadas en la enfermedad de Alzheimer (EA). Nuestro trabajo se ha centrado en la proteína tau (y sus modificaciones), siendo una modificación relevante su fosforilación. Un nexo de unión entre el péptido amiloide y la proteína tau es la proteína kinasa GSK3, que se activa en presencia del péptido amiloide y que es la que preferentemente modifica (fosforila) a tau. Por ello, hemos venido estudiando un ratón transgénico que sobreexpresa GSK3, como posible modelo de la EA. Estudiando en este modelo su neurogénesis adulta, hemos observado que el efecto tóxico de GSK3 en el giro dentado (donde se produce neurogénesis adulta) correlaciona con la aparición de tau en la células neuronales.

La toxicidad debida a tau puede dar lugar, mediante muerte celular o exocitosis, a la presencia de tau extracelular que puede ser tóxico no solo para las neuronas adyacentes sino también para células de glía como las de microglía. Actualmente estamos estudiando estos mecanismos tóxicos.

Por otra parte, además del péptido beta amiloide y de la proteína tau, pueden existir otros factores que favorezcan la aparición de la neurodegeneración. Entre estos factores pueden existir mutaciones somáticas en células cerebrales. En nuestro grupo, hemos desarrollado una nueva técnica para el reconocimiento de estas posibles mutaciones somáticas.

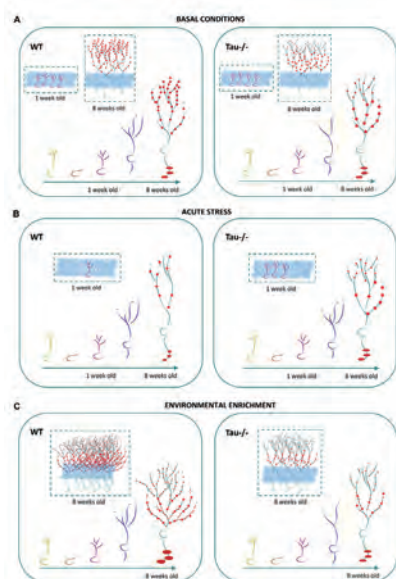


Figura 1. Tau controla la maduración de las nuevas neuronas granulares en condiciones basales. Además, esta proteína es necesaria para que tenga lugar la regulación de la neurogénesis adulta ejercida tanto por estímulos negativos (estrés) como positivos (enriquecimiento ambiental).

Figure 1. Tau is necessary for the maturation of newborn granule neurons under basal conditions. Furthermore, it regulates the effects of both negative (stress) and positive (environmental enrichment) external stimuli on adult hippocampal neurogenesis.

Research summary

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of two aberrant structures, senile plaques (composed by beta amyloid peptide) and neurofibrillary tangles (containing tau protein in modified form). A main hypothesis to explain the mechanism for AD is that beta amyloid peptide ($A\beta$) could initiate the process whereas tau protein is mainly involved in the execution of the toxic effect. In agreement with that hypothesis, is well known that $A\beta$ could be present in almost every cell type whereas tau is a neuronal protein. In this way, neurons are mainly, the damaged cells in AD. Our work is mainly focused on tau protein and its modifications. A relevant tau modification is its phosphorylation and a link between $A\beta$ and tau is the protein kinase GSK3. This kinase could be activated by $A\beta$ and it modifies (phosphorylation) many sites on tau protein. In this way, we have used a transgenic mouse model overexpressing GSK3 in neuronal cells, as a possible model for AD. In this model, by looking at the adult neurogenesis taking place at the dentate gyrus, we found that GSK3 toxicity correlates with the appearance of tau during the development of newborn neurons. That toxic effect could result in neuron death or in the exocytosis of extracellular tau. In both cases, extracellular tau could be present and this extracellular protein appears to be toxic for surrounding neurons and some glia cells, like microglia. At the present time, we are looking for the mechanism of those toxic effects.

On the other hand, it has been also suggested that there are other factors, independent of $A\beta$ or tau, that could facilitate the onset of dementia, and a possibility could be the presence of brain somatic mutations. In our group, we have developed a novel method to look for possible brain somatic mutations.

Publicaciones / Publications

Avila, J., Gomez-Ramos, A., and Bolos, M. (2015). *Front Aging Neurosci* **7**, 99.

Avila, J., Perry, G., Strange, B.A., and Hernandez, F. (2015). *Front Neurosci* **9**, 145.

Berrocal, M., Corbacho, I., Vazquez-Hernandez, M., Avila, J., Sepulveda, M.R., and Mata, A.M. (2015). *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1465-1476.

Bolos, M., Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Hernandez, F., Rabano, A., and Avila, J. (2015). *J Alzheimers Dis* **50**, 77-87.

Calero, M., Gomez-Ramos, A., Calero, O., Soriano, E., Avila, J., and Medina, M. (2015). *Front Cell Neurosci* **9**, 138.

Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Miras-Portugal, M.T., and Avila, J. (2015). *Subcell Biochem* **76**, 375-385.

Gomez-Ramos, A., Podlesniy, P., Soriano, E., and Avila, J. (2015). *Sci Rep* **5**, 18012.

Jurado-Arjona, J., Goni-Oliver, P., Rodriguez-Prada, L., Engel, T., Henshall, D.C., Avila, J., and Hernandez, F. (2015). *Brain Res* **1611**, 84-92.

Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., and Hernandez, F. (2015). *Experimental neurology* **263**, 285-292.

Llorens-Martin, M., Rabano, A., and Avila, J. (2015). *Front Neurosci* **9**, 526.

Medina, M., and Avila, J. (2015). *Expert review of neurotherapeutics* **15**, 115-122.

Sayas, C.L., Tortosa, E., Bollati, F., Ramirez-Rios, S., Arnal, I., and Avila, J. (2015). *J Neurochem* **133**, 653-667.

Sebastian-Serrano, A., de Diego-Garcia, L., Martinez-Frailes, C., Avila, J., Zimmermann, H., Millan, J.L., Miras-Portugal, M.T., and Diaz-Hernandez, M. (2015). *Comput Struct Biotechnol J* **13**, 95-100.

Avila, J., Pallas, N., Bolos, M., Sayas, C.L., and Hernandez, F. (2016). *Expert Opin Ther Targets* **20**, 653-661.

Fernandez-Nogales, M., Santos-Galindo, M., Merchan-Rubira, J., Hoozemans, J.J., Rabano, A., Ferrer, I., Avila, J., Hernandez, F., and Lucas, J.J. (2016). *Brain Pathol.* **27**, 314-322.

Garcia-Ayllon, M.S., Botella-Lopez, A., Cuchillo-Ibanez, I., Rabano, A., Andreasen, N., Blennow, K., Avila, J., and Saez-Valero, J. (2016). *Mol Neurobiol* **54**, 188-199.

Houck, A.L., Hernandez, F., and Avila, J. (2016). *J Exp Neurosci* **10**, 31-38.

Jurado-Arjona, J., Llorens-Martin, M., Avila, J., and Hernandez, F. (2016). *J Biol Chem* **291**, 8199-8213.

Leon-Espinosa, G., Garcia, E., Gomez-Pinedo, U., Hernandez, F., DeFelipe, J., and Avila, J. (2016). *Neuroscience* **333**, 181-192.

Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Bolos, M., Pallas-Bazarra, N., and Avila, J. (2016). *Brain Behav Immun* **53**, 242-254.

Llorens-Martin, M., Teixeira, C.M., Jurado-Arjona, J., Rakwal, R., Shibato, J., Soya, H., and Avila, J. (2016). *Cell Mol Life Sci* **73**, 3569-3582.

Martin-Maestro, P., Gargini, R., Perry, G., Avila, J., and Garcia-Escudero, V. (2016). *Hum Mol Genet* **25**, 792-806.

Medina, M., Hernandez, F., and Avila, J. (2016). *Biomolecules* **6**, E21.

Moreno, H., Morfini, G., Buitrago, L., Ujlaki, G., Choi, S., Yu, E., Moreira, J.E., Avila, J., Brady, S.T., Pant, H., et al. (2016). *Neuroscience* **325**, 30-38.

Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J.A., Hernandez, F., Avila, J., and Llorens-Martin, M. (2016). *EMBO J* **35**, 1417-1436.

Rabano, A., Cuadros, R., Merino-Serrais, P., Rodal, I., Benavides-Piccione, R., Gomez, E., Medina, M., DeFelipe, J., and Avila, J. (2016). *Methods Mol Biol* **1303**, 143-160.

Ramirez-Rios, S., Denarier, E., Prezel, E., Vinit, A., Stoppin-Mellet, V., Devred, F., Barbier, P., Peyrot, V., Sayas, C.L., Avila, J., et al. (2016). *Mol Biol Cell.* **27**, 2924-2934.

Sanchez-Mut, J.V., Heyn, H., Vidal, E., Moran, S., Sayols, S., Delgado-Morales, R., Schultz, M.D., Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Pons-Espinal, M., et al. (2016). *Transl Psychiatry* **6**, e718.

Torres-Cruz, F.M., Rodriguez-Cruz, F., Escobar-Herrera, J., Barragan-Andrade, N., Basurto-Islas, G., Ripova, D., Avila, J., and Garcia-Sierra, F. (2016). *J Alzheimers Dis* **52**, 463-482.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Noemí Pallas Bazarra (2015). "Estudio del papel de la proteína tau en la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta". Universidad Autónoma de Madrid. Félix Hernández y María Llorens.

Patricia Martín-Maestro Rojas (2016). "Mitophagy dysfunction in peripheral and neural models of Alzheimer disease". Universidad Autónoma de Madrid. Jesús Avila y Vega García-Escudero Barreras.

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 / <i>Group Leader:</i> María Jesús Bullido	Técnicos de Investigación / <i>Technical Assistance:</i> Isabel Sastre Merlín
Postdoctorales / <i>Postdoctoral Fellows:</i> Jesús Aldudo Soto María Recuero Vicente	Estudiantes / <i>Undergraduate Students:</i> Manuel Manchón Romero Julia Terreros Roncal Ana Toledano Zaragoza Sara Villa Daniel Jiménez
Becarios Predoctorales / <i>Graduate Students:</i> Henrike Kristen Patricia Llorente Ginés	

Resumen de investigación

Para identificar genes y mecanismos involucrados en la neurodegeneración característica de la enfermedad de Alzheimer (EA), contamos con modelos celulares que reflejan diferentes aspectos de la patogénesis de la enfermedad. Estos modelos nos permiten la identificación de nuevos genes/funciones asociados con la EA, que podrían ser dianas terapéuticas para la misma. Para ello, analizamos la expresión génica diferencial en los modelos y desarrollamos después estudios de asociación genética en muestras caso control. Actualmente, contamos con modelos de estrés oxidativo (EO) y de infección por el virus herpes simplex 1 (HSV 1) que presentan marcadores característicos de la EA, entre los que destacan alteraciones en el tráfico, metabolismo y proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP), así como en la fosforilación de la proteína tau.

El estudio de la vía autofagia lisosoma en estos modelos nos ha mostrado que la infección por HSV 1 y el EO afectan profundamente a las etapas finales de la ruta, provocando un aumento del contenido celular de lisosomas acompañado de una reducción significativa en la actividad de diferentes catepsinas y en la degradación de sustratos lisosomales. La comprobación de que otro alfa-herpesvirus con propiedades neurotrópicas, el HSV 2, induce los mismos marcadores de neurodegeneración que HSV 1, apoya la posible implicación de diversos agentes infecciosos en la neurodegeneración asociada a la EA. En conjunto, los resultados de los estudios funcionales, de expresión génica y de asociación genética que hemos desarrollado hasta el momento apoyan la hipótesis de que el fallo de la función lisosomal podría constituir un mecanismo relevante en la neurodegeneración, tanto en los modelos como en los pacientes de EA. Por ello, nuestro grupo está actualmente centrado en el análisis de esta ruta funcional, ampliando el estudio a nuevos modelos celulares que incluyen células iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes y controles

Además, participamos en numerosos proyectos colaborativos para la búsqueda de factores genéticos implicados en la EA, principalmente en el marco del Consorcio Español de Genética de las Demencias (DEGESCO), así como de los consorcios internacionales EADI e IGAP, que continúan revelando nuevos factores y funciones relevantes en la patogénesis de esta enfermedad.

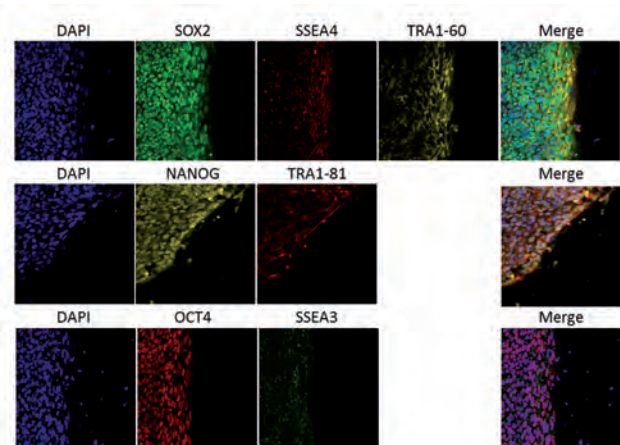


Figura 1. Células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos procedentes de un paciente con la enfermedad de Alzheimer. La figura muestra la expresión de diferentes marcadores asociados a pluripotencia.

Figure 1. Human induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from fibroblasts from a patient with Alzheimer's disease. The figure shows the expression of different marker proteins associated with pluripotency.

Autor: Henrike Kristen

Research summary

Genetic bases of Alzheimer's disease: Genomic study of pathogenic cell models. To identify genes and mechanisms involved in the neurodegeneration process characteristic of Alzheimer's disease (AD), we have developed cellular models simulating different aspects of AD pathogenesis. These models are intended to identify novel genes/processes involved in AD, that could constitute therapeutic targets, by means of the study of gene expression in the models complemented with genetic association studies in case-control samples. Currently, we work on models of oxidative stress (OS) and of herpes simplex type 1 virus (HSV-1) infection. These models present markers characteristic of AD, like the alterations in amyloid precursor protein (APP) traffic, metabolism and proteolysis and in tau protein phosphorylation.

The study of the autophagy lysosome pathway in these models has shown us that infection with HSV-1 and OS profoundly affect the final steps of the route, causing an increased cellular burden of lysosomes accompanied by a significant reduction in the activity of different cathepsins and decreased degradation of lysosomal substrates. Furthermore, we found that another alpha herpesvirus with neurotropic properties, HSV-2, is also able to induce the main neurodegeneration markers previously observed for HSV-1, supporting the potential of diverse infectious agents to participate in the neurodegeneration associated to AD. Together, results of the functional, gene expression and genetic association studies reinforce the hypothesis that a failure of the lysosomal function is a relevant neurodegeneration mechanism, both in the models and in AD patients, so we are currently centered on the analysis of this functional pathway, extending the study to new models that include iPSCs derived from patients and controls skin fibroblasts.

We also participate in several collaborative projects searching for novel AD genetic risk factors, mainly as part of the Dementia Genetics Spanish Consortium (DEGESCO), as well as with the EADI and IGAP consortia, actively revealing novel factors and functions potentially relevant in the pathogenesis of AD.

Publicaciones / Publications

Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, Bullido MJ, Carter C, et al. (2016) Microbes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **51**: 979-984.

Jun G, Ibrahim-Verbaas CA, Vronskaya M, Lambert JC, Chung J, Naj AC, et al. Bullido MJ. (2016) A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein. *Mol Psychiatry* **21**: 108-17.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airolidi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akporiaye ET, Al-Rubeai M, Albaiceta GM, Albanese C, Albani D, Albert ML, Aldudo J, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**(1): 1-222.

Pastor P, Moreno F, Clarimón J, Ruiz A, Combarros O, Calero M, De Munain AL, Bullido MJ, et al (2015). MAPT H1 haplotype is associated with late-onset Alzheimer's disease risk in APOE ε 4 noncarriers: Results from the dementia genetics Spanish consortium. *J Alzheimers Dis* **49**: 343-352.

Kristen H, Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J (2015) Herpes simplex virus type 2 infection induces AD-like neurodegeneration markers in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging* **36**: 2737-2747.

Jones L, Lambert JC, Wang LS, Choi SH, Harold D, Vedernikov A, et al. Bullido MJ (2015) Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dementia* **11**: 658-671.

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

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Alfredo Giménez-Cassina

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 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. Es por ello que, de manera más general, también estamos interesados en el papel crucial del metabolismo mitocondrial en la homeostasis celular y de sus alteraciones en situaciones patológicas.

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. En particular estamos prestando una atención especial a los factores neurotróficos y a los fármacos capaces de estimular la producción y/o señalización de dichos factores.

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.

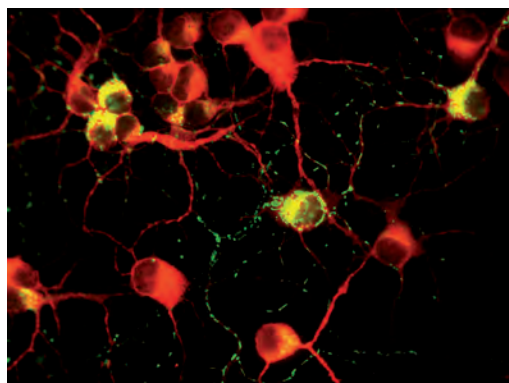


Figura 1. Localización mitocondrial de la frataxina expresada en neuronas granulares de cerebelo mediante un vector lentiviral.

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 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. Thus, in a broader context, we are also interested in the key role of mitochondrial metabolism for cell homeostatic signaling and of its alterations in degenerative diseases.

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. In particular we have focused on neurotrophic factors and drugs able to stimulate their production and/or signaling.

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

Peng X, Giménez-Cassina A, Petrus P, Conrad M, Rydén M, Arnér ES. (2016) Thioredoxin reductase 1 suppresses adipocyte differentiation and insulin responsiveness. *Sci Rep.* **6**:28080.

Katsu-Jiménez Y, Loria F, Corona JC, Díaz-Nido J. (2016) Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Prevents Neurodegeneration Triggered by FXN Deficiency. *Mol Ther.* **24**:877-89.

Klionsky DJ, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* **12**:1-222.

Vadivelu RK, Ooi CH, Yao RQ, Tello Velasquez J, Pastrana E, Díaz-Nido J, Lim F, Ekberg JA, Nguyen NT, St John JA. (2015) Generation of three-dimensional multiple spheroid model of olfactory ensheathing cells using floating liquid marbles. *Sci Rep.* **5**:15083.

Pérez-Luz S, Gimenez-Cassina A, Fernández-Frías I, Wade-Martins R, Díaz-Nido J. (2015) Delivery of the 135 kb human frataxin genomic DNA locus gives rise to different frataxin isoforms. *Genomics.* **106**(2):76-82.

Loría F, Díaz-Nido J. (2015) Frataxin knockdown in human astrocytes triggers cell death and the release of factors that cause neuronal toxicity. *Neurobiol Dis.* **76**:1-12.

Otras actividades / Other activities

Nuestro Grupo de Investigación también forma parte del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM).

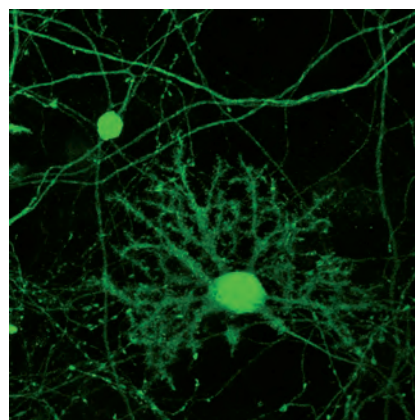
Además de nuestra actividad investigadora, estamos fuertemente comprometidos con la mejora e innovación de la enseñanza/aprendizaje de la Biomedicina, así como en la difusión social de los avances de la investigación biomédica. Javier Díaz-Nido desarrolla labores docentes en la Universidad Autónoma de Madrid, donde además es Director de la Escuela de Doctorado.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Jara Moreno Lorite (24-07-2015). Alteraciones en el transcriptoma y en las vías de reparación del DNA en modelos celulares neurales de la ataxia de Friedreich. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Javier Díaz-Nido y Sara Pérez-Luz.

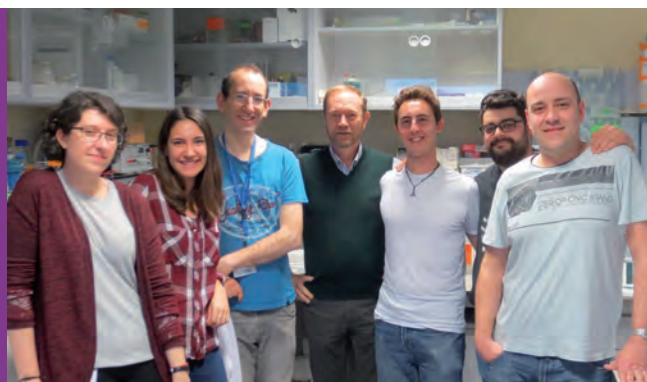
Figura 2. Neurona de Purkinje de cerebelo de ratón en cultivo primario.

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

Postdoctorales /

Postdoctoral Fellows:

David Bartolomé Martín

Becarios Predoctorales /

Raquel de Andrés Hernáiz

Técnicos de Investigación /

Technical Assistance:

Alberto Garrido García

Estudiantes / Undergraduate Students:

Alba Huerga Gómez

Fernando Martín Fernández

Roberto Bilbao Canalejas

Irene Costa Laparra

Resumen de investigación

Nuestra memoria está codificada por cambios a largo plazo en la conectividad sináptica. Un conocimiento en profundidad de las bases moleculares de la regulación sináptica es fundamental para descifrar los mecanismos que intervienen en la formación de los recuerdos. Nuestra investigación está dirigida a la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que modulan la plasticidad de las redes neuronales. La actividad sináptica desencadena oscilaciones intracelulares del calcio que regulan un número de vías de señalización. Calmodulina (CaM), una proteína que une calcio, interpreta dichas oscilaciones y las traduce para iniciar una gran variedad de señales intracelulares. Su disponibilidad y actividad son reguladas localmente por proteínas como Neurogranina (Ng), muy abundante en el entorno post-sináptico, que secuestra CaM de forma dependiente de calcio y fosforilación. Utilizamos cultivos primarios de neuronas disociadas cuya expresión de Ng ha sido silenciada o aumentada con intención de comprender su papel en la facilitación de eventos de plasticidad sináptica, tales como los asociados a la plasticidad hebbiana (LTP, LTD) o la plasticidad homeostática. Usando estos paradigmas, analizamos el papel de Ng sobre la actividad de vías de señalización en las que intervienen distintas proteínas quinasas (CaMKII, PKC, PKA, ERK, Akt), sobre la inserción sináptica de receptores de glutamato y sobre las propiedades eléctricas de las neuronas. Para ello utilizamos una combinación de técnicas bioquímicas, de biología molecular, electrofisiología y técnicas avanzadas de microscopía. También estudiamos la regulación de la transcripción de Ng y su traducción local en dendritas. Es sabido que la deficiencia de Ng no causa anomalías anatómicas o fisiológicas. Además, su expresión se restringe al prosencéfalo postnatal y se asocia específicamente con el rendimiento cognitivo. Por ello, proponemos a Ng como diana molecular que posibilite el desarrollo de estrategias para prevenir, tratar o aliviar condiciones y patologías asociadas a alteraciones de la función cognitiva. Un conocimiento más amplio y profundo del papel de Ng y otras proteínas secuestradoras de CaM en el contexto de la plasticidad neuronal permitirá la aparición de terapias más específicas que mejorarán la función cognitiva y la calidad de vida de personas mayores y de pacientes que sufren enfermedades neurológicas.

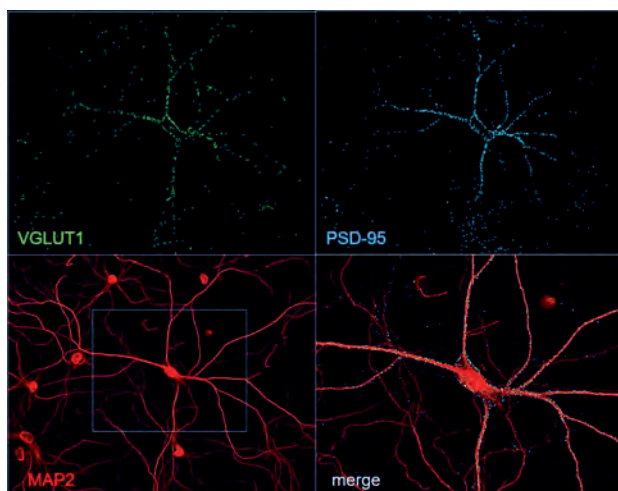


Figura 1. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 18 días y teñidas para marcadores presinápticos (VGLUT) y postsinápticos (PSD-95) de sinápsis excitadora, y para un marcador de compartimento somatodendrítico neuronal (MAP2). En la imagen de fundido (merge), las sinapsis excitadoras individuales están representadas por puntos claros adyacentes a las dendritas. excitadoras individuales están representadas por puntos claros adyacentes a las dendritas.

Figure 1. Hippocampal neurons grown during 18 days in culture and stained for excitatory presynaptic (VGLUT) and postsynaptic (PSD-95) markers, and for a neuronal-specific somatodendritic marker (MAP2). In the merge image, individual excitatory synapses are represented by clear dots adjacent to dendrites.

Research summary

Memories are encoded by long-term changes in synaptic connectivity. An in-depth knowledge of the molecular basis of synaptic regulation is fundamental to decipher the mechanisms involved in the formation of memories. Our research is aimed at understanding the cellular and molecular mechanisms that modulate the plasticity of neural networks. Synaptic activity triggers intracellular calcium oscillations that modulate a number of signaling pathways. Calmodulin (CaM), a protein that binds calcium, interprets these oscillations and translates them to initiate a variety of intracellular signaling events. Its availability and activity are locally regulated by proteins such as neurogranin (Ng), very abundant in the post-synaptic environment, which sequesters CaM in a calcium and phosphorylation dependent manner. We use primary cultures of dissociated neurons whose Ng expression is either silenced or enhanced, in an attempt to understand its role in the facilitation of synaptic plasticity events, such as those associated with hebbian plasticity (LTP, LTD) or synaptic scaling. Using these paradigms, we analyze the role of Ng on the activity of signaling pathways involving different protein kinases (CaMKII, PKC, PKA, ERK, Akt), on the synaptic insertion of glutamate receptors and on the electrical properties of neurons. To do this we use a combination of biochemical, molecular biology, electrophysiology and advanced microscopy techniques. We also study the regulation of Ng transcription and its local translation in dendrites. It is known that Ng deficiency does not cause anatomical or physiological abnormalities. In addition, its expression is restricted to the postnatal forebrain and specifically associated to cognitive performance. Therefore, we propose Ng as a molecular target to develop strategies to prevent, treat or alleviate conditions and pathologies associated to impaired cognitive function. A broader and deeper understanding of the role of Ng and other CaM-sequestering proteins in the context of neuronal plasticity will allow the emergence of more specific therapies that will improve the cognitive function and quality of life of aging individuals and patients suffering from neurological diseases.

Publicaciones / Publications

Ibáñez I., Díez-Guerra F.J., Giménez, C. and Zafra, F. (2016) Activity dependent internalization of the glutamate transporter GLT-1 mediated by β -arrestin 1 and ubiquitination. *Neuropharmacology*. **107**:376-86.

Laboratorio de diferenciación y envejecimiento neuronal

Neuronal differentiation and brain aging



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Carlos Dotti

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Mauricio Martín
Isabela Alonso González

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Stefano Benvegnú
Mauricio Martín

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ernest Palomer Vila
Adrián Martín Segura
Silvia de Vidania Ballester
Álvaro Casadomé Perales

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Irene Palomares Pérez

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Marta Castellana Cruz
Marina Simón Martín

Resumen de investigación

Envejecimiento se refiere a la condición vital que afecta la función de múltiples órganos, incluyendo el cerebro. Con la edad, las neuronas van perdiendo su capacidad para recuperarse de las alteraciones acumuladas con el paso del tiempo, con la resultante de pérdida de función. A nivel sistémico, una de las consecuencias es la aparición de déficits de aprendizaje y de memoria. Dado que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la aparición de síndromes de demencia como el Alzheimer, se hace evidente que el estudio de los mecanismos responsables del envejecimiento neuronal puede aportar algo de luz a los mecanismos responsables de la aparición de demencias. Este es el objetivo de nuestro laboratorio. Para abordar este objetivo, utilizamos dos tipos de enfoques: i) búsqueda desprejuiciada de genes que podrían actuar como “interruptores maestros” para los déficit cognitivos asociados a la edad y ii) búsqueda “educada”, enfocándonos en genes conocidos que puedan tener dicha función de “interruptor maestro”. Como resultado del segundo tipo de enfoques, hemos demostrado que el envejecimiento se acompaña por un incremento en los niveles de expresión de un gen llamado Cyp46A1, que controla el catabolismo del colesterol cerebral. Que dicho aumento pueda ser un regulador maestro lo sugiere la disminución de la cantidad de colesterol neuronal que acompaña el envejecimiento. Como corresponde a un interruptor maestro, la disminución de colesterol de membrana neuronal contribuye a los déficits de aprendizaje y memoria del viejo a través de la inducción de cambios bioquímicos y de la expresión de genes específicos. A partir de estas evidencias, hemos comenzado el trabajo para determinar qué hace que este mecanismo fisiológico de déficit cognitivo en el viejo se incline hacia su forma patológica, como ocurren con las demencias seniles.

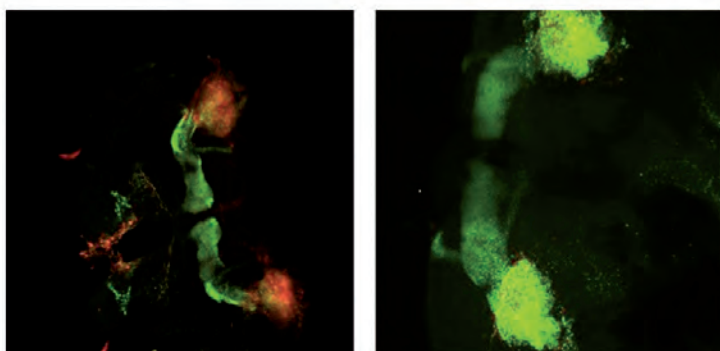


Figura 1. Transportadores de membrana que presentan defectos en el transporte axonal en el mushroom body de neuronas viejas de *Drosophila* (Panel derecho).

Figure 1. Membrane carriers appear to suffer axon-transport defects in mushroom body neurons of old *Drosophila* (Right panel).

Research summary

Aging is associated with several physiological modifications occurring in multiple organs including the brain. With advancing age, neurons lose their capability to adapt and to recover from accumulating and potentially damaging alterations such as oxidative stress, DNA breaks, accumulation of dysfunctional organelles, abnormal protein aggregates and several others, resulting in functional deficits. At the systemic level, one of the most evident functional consequences of cellular aging is the occurrence of learning and memory deficits. Then, if one considers that aging is the main risk factor for the appearance of dementia syndromes like Alzheimer's, it becomes evident that the study of the mechanisms responsible for neuronal aging may bring some light into the mechanisms responsible for dementias. To tackle this question our laboratory takes two large types of approaches: i) unbiased screening to identify up and down-regulated genes which could act as master switches for age-associated cognitive deficits and ii) educated-guessing screenings, for the same purpose. As result of the second type of approaches, we have demonstrated that ageing comes with the gradual upregulation of a gene (called *Cyp46A1*) that controls the levels of free cholesterol in neuronal cells. This up-regulation is in part responsible for a decrease in the amount of cholesterol in the plasma membrane of neuronal cells, especially at the level of the synapse. As could not be otherwise, the consequences of having reduced levels of this major plasma membrane lipid are multiple, among which we have identified defects in the rate of internalization of receptors involved in excitatory neurotransmission and defects in the expression of learning and memory genes, all in all contributing to the cognitive deficits of the old. We have begun the work to determine what determines that this physiological mechanism underlying normal cognitive deficit in the old is tilted to the pathological, dementia-like, condition.

Publicaciones / Publications

Palomer E, Martín-Segura A, Baliyan S, Ahmed T, Balschun D, Venero C, Martín MG, Dotti CG. (2016) Aging Triggers a Repressive Chromatin State at *Bdnf* Promoters in Hippocampal Neurons. *Cell Reports* **16**:2889-900.

Laranjeira A, Schulz J, Dotti CG. (2016) Genes Related to Fatty Acid β -Oxidation Play a Role in the Functional Decline of the *Drosophila* Brain with Age. *PLoS One*. **11**:e0161143.

Ungureanu AA, Benilova I, Krylychikina O, Braeken D, De Strooper B, Van Haesendonck C, Dotti CG, Bartic C. (2016) Amyloid beta oligomers induce neuronal elasticity changes in age-dependent manner: a force spectroscopy study on living hippocampal neurons. *Sci Rep*. **6**:25841.

Palomer E, Carretero J, Benvegnù S, Dotti CG*, Martín MG. (2016) Neuronal activity controls *Bdnf* expression via Polycomb de-repression and CREB/CBP/JMJD3 activation in mature neurons. *Nature Commun*. **7**:11081. (* co-corresponding autor)

Knafo S, Sánchez-Puelles C, Palomer E, Delgado I, Draffin JE, Mingo J, Wahle T, Kaleka K, Mou L, Pereda-Perez I, Kiosi E, Faber EB, Chapman HM, Lozano-Montes L, Ortega-Molina A, Ordóñez-Gutiérrez L, Wandosell F, Viña J, Dotti CG, Hall RA, Pulido R, Gerges NZ, Chan AM, Spaller MR, Serrano M, Venero C, Esteban JA. (2016) PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nature Neurosci*. **19**:443-53.

Hernández-Jiménez M, Martínez-López D, Gabandé-Rodríguez E, Martín-Segura A, Lizasoain I, Ledesma MD, Dotti CG, Moro MA. (2016) Seladin-1/DHCR24 Is Neuroprotective by Associating EAAT2 Glutamate Transporter to Lipid Rafts in Experimental Stroke. *Stroke*. **47**:206-13.

Pasciuto E, Ahmed T, Wahle T, Gardoni F, D'Andrea L, Pacini L, Jacquemont S, Tassone F, Balschun D, Dotti CG, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Müller UC, Di Luca M, De Strooper B, Bagni C. (2015) Dysregulated ADAM10-Mediated Processing of APP during a Critical Time Window Leads to Synaptic Deficits in Fragile X Syndrome. *Neuron*. **87**:382-98.

Brachet A, Norwood S, Brouwers JF, Palomer E, Helms JB, Dotti CG*, Esteban JA. (2015) LTP-triggered cholesterol redistribution activates *Cdc42* and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J Cell Biol*. **208**:791-806 (* co-corresponding autor).

Schulz JG, Laranjeira A, Van Huffel L, Gärtner A, Vilain S, Bastianen J, Van Veldhoven PP, Dotti CG. (2015) Glial β -oxidation regulates *Drosophila* energy metabolism. *Sci Rep*. **5**:7805.

Gärtner A, Fornasiero EF, Dotti CG. (2015) Cadherins as regulators of neuronal polarity. *Cell Adh Migr*. **9**:175-82.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ernest Palomer Vila (2016). Epigenetic mechanisms involved in neuronal *Bdnf* gene expression in adult and aged mouse in response to cognitive stimulation. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Carlos G. Dotti.

Mecanismos de plasticidad sináptica y contribución a la función cognitiva

Mechanisms of synaptic plasticity, and contribution to cognitive function



Jefe de Línea / *Group Leader:*
José Antonio Esteban García

Postdoctorales /

Postdoctoral Fellows:

Anna Brachet

Anna Chiarlone

(nov. 2015-octubre 2016)

Marta Navarrete Llinás

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Rocío Palenzuela Muñoz

(enero 2015-abril 2015)

Cristina Sánchez-Puelles

Peñaranda

Jonathan Evan Draffin

Carla Sánchez Castillo

Yolanda Gutiérrez Gonzalo

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:

Raquel Jiménez Sánchez

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Arantzazu San Agustín Pérez

(mayo 2015-julio 2016)

María Franco Guijar

(sept. 2015-julio 2016)

Clara Lobo

(sept. 2015-julio 2016)

Clara de la Rosa del Val

(junio 2016-agosto 2016)

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 la memoria, y está alterado en múltiples enfermedades mentales, como el Alzheimer y varias formas de retraso mental.

A lo largo de los 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 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, utilizamos una combinación de técnicas de biología molecular, microscopía de fluorescencia y electrofisiología.

Recientemente, nuestra investigación se ha concentrado en dos líneas paralelas y complementarias. Por un parte, continuamos descubriendo componentes moleculares y cascadas de señalización que controlan el movimiento de receptores de neurotransmisor en la membrana sináptica durante la plasticidad. Estamos investigando estos mecanismos tanto en neuronas como en células de glía, cuya importancia para la función sináptica cada vez es más apreciada. Por otro lado, usamos modelos animales de ratón en los que algunos de estos componentes están alterados, con objeto de evaluar las consecuencias conductuales y cognitivas de esta alteración molecular. Además, estos modelos animales nos permiten diseñar y testar potenciales aproximaciones terapéuticas para corregir algunas de estas deficiencias. La investigación reciente del laboratorio en esta dirección se está concentrando en la enfermedad de Alzheimer y los trastornos del espectro autista.

En resumen, la aplicación combinada de aproximaciones *in vitro* e *in vivo* nos está permitiendo explorar cómo moléculas individuales y rutas de señalización controlan la función sináptica y determinan nuestra capacidad cognitiva, en la salud y en la enfermedad.

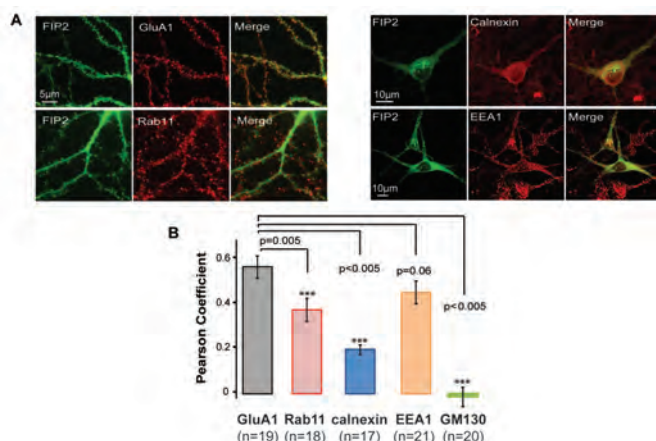


Figura 1. Localización del componente endosomal FIP2 en diferentes compartimentos intracelulares de neuronas hipocámpales. La proteína recombinante GFP-FIP2 se expresó en cultivos de neuronas con un vector viral. A continuación, la localización de los distintos compartimentos se realizó por técnicas de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra marcadores específicos, como se indica en la figura, o contra la subunidad GluA1 de los receptores AMPA (A). La cuantificación de la correlación entre GFP-FIP2 y los distintos marcadores se presenta en el panel B.

Figure 1. Localization of the endosomal factor FIP2 in different intracellular compartments of hippocampal neurons. The recombinant protein GFP-FIP2 is expressed in neuronal cultures using viral vectors. Then, the localization of the different compartments is carried out using antibodies against specific markers, as indicated in the figure, or against the GluA1 subunit of AMPA receptors (A). The quantification of the correlation between GFP-FIP2 and the different markers is presented in 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, our research is concentrated on two parallel and complementary directions. On the one hand, we continue uncovering the molecular components and signaling cascades that control the movement of neurotransmitter receptors in and out of the synaptic membrane during plasticity. We are investigating these mechanisms both in neurons and in glial cells, as important modulators of synaptic function. On the other hand, we are using mouse models in which some of these components are altered, in order to evaluate the behavioral and cognitive consequences of these molecular alterations. In addition, these animal models allow us to design and test potential therapeutic approaches to correct some of these deficits. Recent research of the laboratory in this direction is focusing on Alzheimer's disease and autism spectrum disorders.

In summary, our combined application of *in vitro* and *in vivo* approaches is allowing us to explore how individual molecules and signaling pathways control synaptic function and determine our cognitive abilities in health and disease.

Publicaciones / Publications

Rueda, C. B., Traba, J., Amigo, I., Llorente-Folch, I., González-Sánchez, P., Pardo, B., Esteban, J. A., del Arco, A. and Satrustegui, J. (2015) Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCA3/SLC25A23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons. *J. Neurosci.* **35**, 3566-3581.

Mignogna, M. L., Giannandrea, M., Gurgone, A., Fanelli, F., Raimondi, F., Mapelli, L., Bassani, S., Fang, H., Van Anken, F., Alessio, M., Passafaro, M., Gatti, S., Esteban, J. A., Hugarir, R. and D'Adamo, P. (2015) The intellectual disability protein RAB39B selectively regulates GluA2 trafficking to determine synaptic AMPAR composition. *Nat. Commun.* **6**.

Brachet, A., Norwood, S., Brouwers, J. F., Palomer, E., Helms, J. B., Dotti, C. G. and Esteban, J. A. (2015) LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J. Cell Biol.* **208**, 791-806.

Dominguez-Iturza, N., Calvo, M., Benoist, M., Esteban, J. A. and Morales, M. (2016) Hip-pocampal dendritic spines are segregated depending on their actin polymerization rate. *Neural Plast.*

Sanz-García, A., Knafo, S., Pereda-Pérez, I., Esteban, J. A., Venero, C. and Armario, A. (2016) Administration of the TrkB receptor agonist 7,8-dihydroxyflavone prevents traumatic stress-induced spatial memory deficits and changes in synaptic plasticity. *Hippocampus* **26**, 1179-1188.

Pérez-Cañamás, A., Sarroca, S., Melero-Jerez, C., Porquet, D., Sansa, J., Knafo, S., Esteban, J. A., Sanfeliu, C. and Ledesma, M. D. (2016) A diet enriched with plant sterols prevents the memory impairment induced by cholesterol loss in senescence-accelerated mice. *Neurobiol. Aging* **48**, 1-12.

Rodríguez-Tornos, F. M., Briz, C. G., Weiss, L. A., Sebastián-Serrano, A., Ares, S., Navarrete, M., Frangeul, L., Galazo, M., Jabaudon, D., Esteban, J. A. and Nieto, M. (2016) Cux1 enables interhemispheric connections of layer II/III neurons by regulating Kv1-dependent firing. *Neuron* **89**, 494-506.

Pallas-Bazarra, N., Jurado-Arjona, J., Navarrete, M., Esteban, J. A., Hernández, F., Ávila, J. and Llorens-Martín, M. (2016) Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J.* **35**, 1417-1436.

Fernández-Monreal, M., Sánchez-Castillo, C. and Esteban, J. A. (2016) APPL1 gates long-term potentiation via its pleckstrin homology domain. *J. Cell Sci.* **129**, 2793-2803.

Knafo, S., Sánchez-Puelles, C., Palomer, E., Delgado, I., Draffin, J. E., Mingo, J., Wahle, T., Kaleka, K., Mou, L., Pereda-Pérez, I., Klosi, E., Faber, E. B., Chapman, H. M., Lozano-Montes, L., Ortega-Molina, A., Ordóñez-Gutiérrez, J., Wandosell, F., Viña, J., Dotti, C. G., Hall, R. A., Pulido, R., Gerges, N. Z., Chan, A. M., Spaller, M. R., Serrano, M., Venero, C. and Esteban, J. A. (2016) PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nat. Neurosci.* **19**, 443-453.

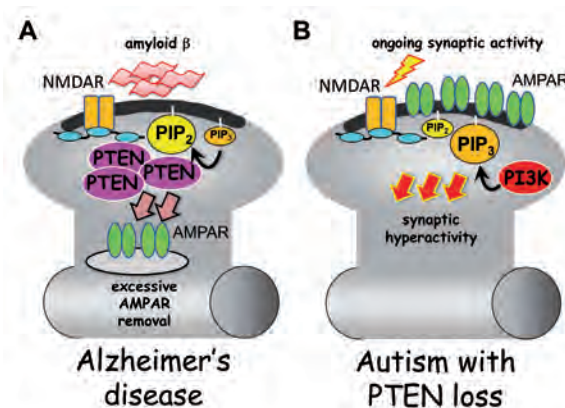


Figura 2. Modelo de la posible implicación de la proteína reguladora de fosfoinosítidos PTEN en la enfermedad de Alzheimer y en algunos trastornos autistas. A. El reclutamiento de PTEN a la membrana sináptica inducido por el beta-amiloide provocaría una eliminación excesiva de receptores AMPA de la sinapsis, con la consiguiente depresión sináptica. B. La ausencia de PTEN en algunas formas de autismo impediría la eliminación de receptores AMPA de la sinapsis, dando lugar a una hiperactivación patológica de estas sinapsis. (Adaptado de Knafo and Esteban, Trends Neurosci. 2017).

Figure 2. Model of the potential implication of the phosphoinositide regulatory protein PTEN in Alzheimer's disease and in some autism spectrum disorders. A. The recruitment of PTEN to the synaptic membrane induced by beta-amyloid leads to an excessive removal of AMPA receptors from synapses, with the subsequent synaptic depression. B. The absence of PTEN in some forms of autism prevents the elimination of AMPA receptors from synapses, leading to a pathological hyperactivation of these synapses. (Adapted from Knafo and Esteban, Trends Neurosci. 2017).

Bases moleculares de las sinápsis glutamatergicas

Molecular bases of glutamatergic synapses



Jefes de Línea / Group Leaders:

Cecilio Giménez Martín
Francisco Zafra

Personal Científico / Scientific Staff:

Eva Porlan

Postdoctorales / Postdoctoral

Fellows:

David Bartolomé-Martín

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Ignacio Ibáñez
Marina Arribas
Dolores Piniella

Técnico de Investigación /

Technical Assistance:

Enrique Núñez
Mario Correia

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Elena Martínez Blanco

Profesor Visitante /

Visiting Professor:

Angelina Rodríguez
(Univ. Autónoma de Querétaro
México)

Resumen de investigación

El trabajo de nuestro laboratorio está dedicado a la comprensión de los mecanismos moleculares por los que los transportadores de los neurotransmisores de glutamato y de glicina controlan los flujos de estas sustancias neuroactivas entre neuronas y glías, y de esta manera regulan la fisiología de las sinapsis. Además, investigamos cómo la desregulación de estos transportadores, de sus proteínas asociadas, o de la expresión de sus respectivos genes, puede contribuir a la evolución de trastornos neurológicos, en especial de las lesiones isquémicas. En este sentido hemos podido determinar que la actividad catalítica del principal transportador de glutamato dispara una serie de mecanismos de tráfico intracelular dependientes de ubiquitinación, y mediados por adaptadores de la familia de las arrestinas, que reajustan los niveles de transportador en la superficie celular en respuesta a condiciones de isquemia. De especial interés para nuestro laboratorio es la caracterización de mecanismos neuroprotectores que pudieran hacer al cerebro más resistente a las lesiones isquémicas y que se activan en el llamado preconditionamiento isquémico. En este sentido investigamos el papel de una serie de microRNAs que podrían activar estos mecanismos de defensa. También hemos comenzado a valorar el potencial regenerativo de las células madre adultas ya que se sabe que el cerebro isquémico posee cierta capacidad neurogénica, y el bloqueo de la misma tiene efectos deletéreos sobre la regeneración del área dañada. En relación con la neurogénesis, además, la Dra. Porlan mantiene una línea de trabajo sobre los mecanismos moleculares que controlan los procesos neurogénicos y su regulación por diversas quinasas. Por otra parte, mantenemos interés en la función de la glicina como un neurotransmisor inhibitor, en colaboración con el grupo de las Dras. Aragón y López-Corcuera. 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.

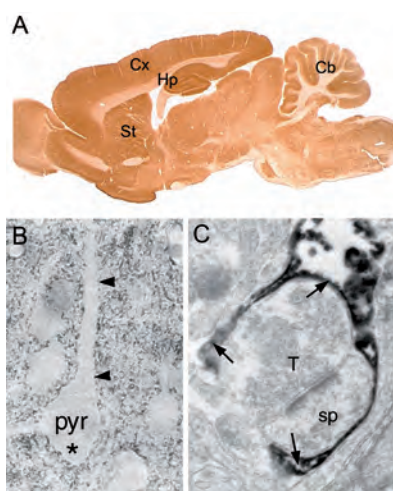


Figura 1. Localización mediante inmunohistoquímica del transportador de aminoácidos SNAT5 en el cerebro de rata a baja resolución (A) y por microscopía óptica (B) o electrónica (C). Nótese en la micrografía electrónica cómo el precipitado de inmunoperoxidasa define perfiles gliales rodeando sinapsis asimétricas (glutamatergicas).

Figure 1. Immunohistochemical localization of amino the acid transporter SNAT5 in the rat brain at low resolution (A), and by optic (B) and electron microscope (C).

Research summary

The work of our laboratory is dedicated to understanding the molecular mechanisms by which the transporters of the neurotransmitters glutamate and glycine control the fluxes of these neuroactive substances between neurons and glial cells and, thus, regulate the physiology of the synapse. In addition, we investigate how the deregulation of these transporters, their associated proteins, or the expression of their respective genes, can contribute to the evolution of neurological disorders, especially ischemic lesions in the brain. In this sense, we have been able to determine that the catalytic activity of the main glutamate transporter triggers a series of ubiquitination-dependent intracellular trafficking events, mediated by adapters of the arrestin family, which might rearrange the transporter levels at the cell surface under ischemic conditions. Of particular interest for our laboratory is the characterization of neuroprotective mechanisms that could make the brain more resistant to ischemic lesions and that are activated in the so-called ischemic preconditioning. In this sense we investigated the role of a series of microRNAs that could activate these defense mechanisms. We have also begun to assess the regenerative potential of adult stem cells, since it is known that the ischemic brain has some neurogenic capacity, and its blockage has deleterious effects on the regeneration of the damaged area. Relative to neurogenesis, moreover, Dr. Porlan maintains a research line on the molecular mechanisms underlying neurogenesis and its regulation by diverse kinases. On the other hand, we maintain interest in the role of glycine as a neurotransmitter inhibitor, in collaboration with the group of Drs. Aragón and López-Corcuera. Finally, we have recently been interested in studying the molecular mechanisms that control the traffic and function of Nav1.1 sodium channels, whose dysfunction is at the basis of a severe form of myoclonic epilepsy called Dravet's Syndrome.

Publicaciones / Publications

Ibáñez, I., Díez-Guerra, F.J., Giménez, C., Zafra, F. (2016) Activity dependent internalization of the glutamate transporter GLT-1 mediated by β -arrestin 1 and ubiquitination. *Neuropharmacology* **107**, 376-386.

Jiménez, E., Núñez, E., Ibáñez, I., Zafra, F., Aragón, C., Giménez, C. (2015) Glycine transporters GlyT1 and GlyT2 are differentially modulated by glycogen synthase kinase 3 β . *Neuropharmacology* **89**, 245-254.

Porlan, E., Martí-Prado, B., Consiglio, A., Fariñas, I. (2016) Stable and Efficient Genetic Modification of Cells in the Adult Mouse V-SVZ for the Analysis of Neural Stem Cell Autonomous and Non-autonomous Effects. *J Vis Exp*. **108**, 53282.

Zafra, F., Ibáñez, I., Giménez, C. (2016) Glycinergic transmission: glycine transporter GlyT2 in neuronal pathologies *Neuronal Signaling* **1**, NS20160009.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Ignacio Ibáñez (2016). Estudio de la regulación dependiente de actividad del tráfico intracelular del transportador de glutamato GLT-1. Universidad Autónoma de Madrid. PhD supervisors: F. Zafra and C. Giménez.

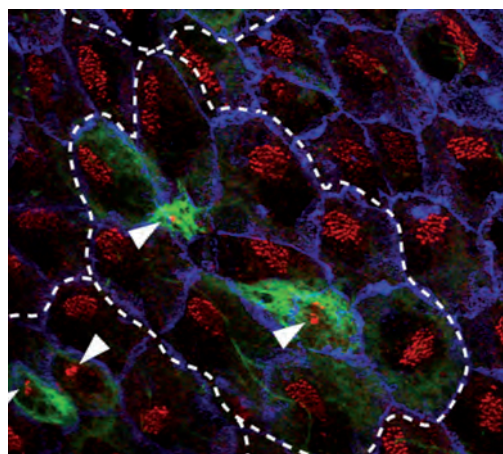
Otras actividades / Other activities

-The group belongs to the Instituto de Investigación Sanitaria IdiPAZ.

-Member of the Center of Biomedical Research Network for rare diseases CIBERER. Instituto de Salud Carlos III.

Figura 2. Inmunotinción in toto de la superficie del ventrículo lateral del cerebro de ratón mostrando las células endodimarias (β -catenina, azul), definiendo un "molinillo" (línea punteada) entorno a dos células madres (GFAP, verde). Nótese la presencia de múltiples cilios en las células endodimarias (γ -tubulina de cuerpos basales teñida en rojo) y de un solo cilio en la célula madre (cabezas de flecha).

Figure 2. Whole-mount immunostaining of the lateral ventricle surface in the mouse brain showing endodimary cells (β -catenin, in blue), defining a pinwheel structure (dashed line) around two stem cells (GFAP, in green). Notice the presence of multiple cilia in the endodimary cells (basal bodies stained for γ -tubulin, in red) and single cilia in the stem cells (arrowheads).



Lípidos en la fisiología y patología neuronal

Lipids in neuronal physiology and pathology



Jefe de Línea / *Group Leader:*
María Dolores Ledesma Muñoz

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Enrique Gabandé Rodríguez

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Azucena Pérez Cañamás
Adrián Bartoll Andrés

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Beatriz Soto Huelin
Fernando Senovilla Sanz
Guadalupe Pereyra Gómez
Daniel Mitroi
Carlos Carrera Cañas
Raquel Rogero Morón
Venezia Leone

Resumen de investigación

Nuestro laboratorio estudia el papel de los lípidos en la fisiología y patología neuronal. Alteraciones en el metabolismo cerebral lipídico están relacionadas con enfermedades de depósito lisosomal y neurodegenerativas y con el envejecimiento. Comprender sus causas y consecuencias y sus mecanismos moleculares contribuiría a aumentar nuestro conocimiento sobre la fisiología de los lípidos en el cerebro y a desarrollar terapias. Con estos objetivos durante 2015-16 hemos caracterizado las alteraciones cerebrales en esfingolípidos en ratones carentes de la esfingomielinasa ácida (SMAko) y la deficiencia de colesterol en ratones con senescencia acelerada (SAMP8). Los ratones SMAko reproducen la enfermedad lisosomal Niemann Pick tipo A (NPA) que causa neurodegeneración y muerte temprana. Hemos demostrado que el aumento de la esfingomielina en la membrana plasmática de las neuronas SMAko incrementa los niveles de calcio debido a la deslocalización y deficiente actividad de la ATPasa PMCA lo que lleva a la muerte neuronal. El tratamiento oral con un inhibidor de deacetilasas de histonas previno estas alteraciones al aumentar la expresión de la PMCA en ratones SMAko (Pérez-Cañamás et al., *Mol Psychiatry*, 2016 publicación avanzada online). Los estudios en ratones SAMP8 nos han permitido comprender mejor las causas y consecuencias de la pérdida de colesterol en el cerebro envejecido y a probar estrategias para prevenirlo. El aumento de la expresión de la colesterol hidrolasa Cyp46 promueve la pérdida de este lípido afectando a la potenciación a largo plazo necesaria para la memoria. Una dieta enriquecida en esteroides de plantas previno estas alteraciones en los ratones SAMP8. Los resultados obtenidos durante 2015-16 aclaran el papel de la esfingomielina y el colesterol en la fisiología y envejecimiento neuronal y abren perspectivas terapéuticas y anti envejecimiento. Durante este tiempo hemos establecido también colaboraciones sobre la contribución de los lípidos a la infección viral, la inflamación y el ictus.

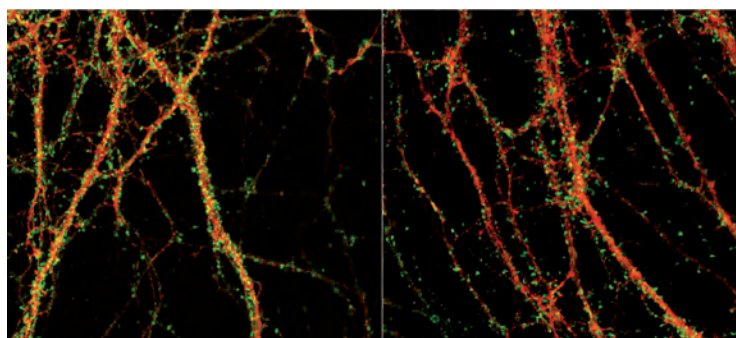


Figura 1. El aumento de esfingomielina desplaza a la PMCA de rafts lipídicos de la membrana plasmática de las neuronas. La figura muestra inmunofluorescencias de la PMCA (rojo) y la toxina cólera que marca rafts (verde) en neuronas hipocámpales en cultivo tratadas (derecha) o no (izquierda) con esfingomielina.

Figure 1. Increased sphingomyelin displaces PMCA from lipid rafts at the plasma membrane of neurons. The image shows the immunofluorescence of PMCA (red) and the raft marker cholera toxin (green) in cultured hippocampal neurons treated (right) or not (left) with sphingomyelin.

Research summary

Research in our laboratory focuses on the role of lipids in neuronal physiology and pathology. Alterations in brain lipid metabolism are related to aging and to many neurological disorders including lysosomal storage diseases and common neurodegenerative conditions. Understanding the causes and consequences of these alterations and the underlying molecular mechanisms will not only increase knowledge in brain lipid physiology but also inspire potential therapies. With these goals during 2015-16 we have characterized brain sphingolipid alterations in mice lacking the acid sphingomyelinase (ASM) and brain cholesterol deficiency in senescence accelerated mice (SAMP8). ASMko mice mimic Niemann Pick disease type A (NPA), a lysosomal storage disorder causing neurodegeneration and early death. We have shown that high sphingomyelin levels at the plasma membranes of ASMko neurons lead to calcium imbalance and cell death by mislocalizing and impairing the activity of the calcium ATPase PMCA. This led us to test in ASMko mice the therapeutical potential of histone deacetylase inhibitors, which prevented these anomalies by enhancing PMCA expression (Pérez-Cañamás et al., *Mol Psychiatry*, 2016 online advanced publication). The study of SAMP8 mice, a model for accelerated aging, allowed us to clarify the causes and consequences of cholesterol loss in the aged brain and to test a non-invasive strategy to counteract them. Increased expression of the cholesterol-degrading enzyme, Cyp46, promotes premature cholesterol loss in these mice impairing long-term potentiation necessary for memory. A diet enriched in plant sterols prevented these alterations and improved memory abilities in SAMP8 mice. The results obtained during 2015-16 contribute to understand the role of sphingomyelin and cholesterol in neuronal physiology and aging and open perspectives to treat fatal diseases like NPA or the aged related cognitive decline. During this time we have also established fruitful collaborations on the lipid contribution to viral infection, inflammation and stroke.

Publicaciones / Publications

Trovò, L., Stroobants, S., D'Hooge, R., Ledesma, M.D. and Dotti C.G. (2015) Improvement of biochemical and behavioral defects in the Niemann-Pick type A mouse by intraventricular infusion of MARCKS. *Neurobiol Dis.* **73**, 319-326.

Baixaoli, F., Acín-Pérez, R., Villarroja-Beltrí, C., Mazzeo, C., Nuñez-Andrade, N., Gabandé-Rodríguez, E., Ledesma, M.D., Blázquez, A., Martín, M.A., Falcón-Pérez, J.M., Redondo, J.M., Enríquez, J.A. and Mittelbrunn M. (2015) Mitochondrial Respiration Controls Lysosomal Function during Inflammatory T Cell Responses. *Cell Metab.* **22**, 485-498.

J.B. Bestard-Esacalas, M.D. Ledesma, M. Taniguchi, T. Okazaki, M.L.Martin, G. Barcelo-Coblijn. (2015) "Unraveling the specific role of sphingomyelins in cell physiology: where are we? In: Catalá, A (ed) Sphingolipids: Biology, Synthesis and Function. *Nova Science Publishers*, pp. 91-128.

Hernández-Jiménez, M., Martínez-López, D., Gabandé-Rodríguez, E., Martín-Segura, A., Lizasoain, I., Ledesma, M.D., Dotti, C.G. and Moro, M.A. (2016) Seladin-1/DHCR24 Is Neuroprotective by Associating EAAT2 Glutamate Transporter to Lipid Rafts in Experimental Stroke. *Stroke.* **47**, 206-213.

Martín-Acebes, M.A., Gabandé-Rodríguez, E., García-Cabrero, A.M., Sánchez, M.P., Ledesma, M.D., Sobrino, F. and Saiz, J.C. (2016) Host Sphingomyelin Increases West Nile Virus Infection *in vivo*. *J Lipid Res.* **57**, 422-432.

Gómez-Sintes, R., Ledesma, M.D. and Boya, P. (2016) Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Res Rev.* **32**, 150-168.

Pérez-Cañamás, A., Sarroca, S., Melero-Jerez, C., Porquet, D., Sansa, J., Knafo, S., Esteban, J.A., Sanfeliu, C. and Ledesma M.D. (2016) A diet enriched with plant sterols prevents the memory impairment induced by cholesterol loss in senescence-accelerated mice. *Neurobiol Aging.* **48**, 1-12.

Otras actividades / Other activities

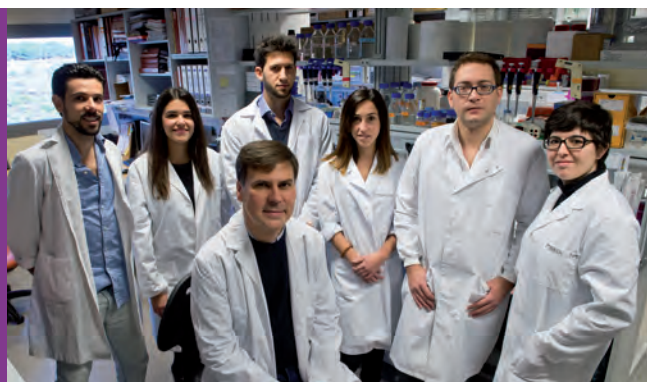
Premio de la Fundación Wylder Nation (<http://wyldernation.org/>) (USA) a la investigación en enfermedades lisosomales (Denver, Julio 2015)

Tesis doctorales / Doctoral theses

Azucena Pérez Cañamás (2015). "Alteraciones de la homeostasis de calcio y estrés oxidativo en neuronas deficientes en la esfingomielinasa ácida. Implicaciones en la enfermedad de Niemann Pick tipo A". Universidad Autónoma 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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Jorge Rubén Cabrera Heredia
Ainara Elorza Peregrina

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ivó Hernández Hernández
Alberto Parras Rodríguez
Sara Picó del Pino

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Miriam Lucas Santamaría
María Santos Galindo

Resumen de investigación

La enfermedad de Huntington (EH) es la más prevalente de las enfermedades neurodegenerativas con causa estrictamente genética, concretamente por una expansión del trinucleótido CAG en el 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). Así descubrimos el desbalance en las isoformas de tau, una proteína implicada en enfermedad de Alzheimer y otras demencias, y una nueva marca histopatológica (los "Tau Nuclear Rods" o TNRs) consistente en la presencia de tau en invaginaciones nucleares en EH. Además, el factor de splicing SRSF6, implicado en el splicing de tau y capaz de unirse a expansiones de CAG, se encuentra alterado en EH y es secuestrado en los cuerpos de inclusión de huntingtina mutada (Nat Med. 2014, 20(8):881-5).

Para caracterizar si tau alterado es suficiente para la aparición de TNRs, hemos empleado un ratón modelo de FTDP17, enfermedad causada por la alteración de tau. La aparición de TNRs en este modelo nos llevó a concluir que su detección podría ser útil como marcador de un desbalance de tau (Brain Pathol. doi: 10.1111/bpa.12407).

También hemos descrito una disminución de GSK3b, una kinasa capaz de fosforilar tau, en EH, y que el fenotipo enfermo puede revertirse mediante la sobreexpresión de esta proteína un modelo de EH (HMG 24(17): 5040-5052).

Asimismo, hemos estudiado los niveles e isoformas de MAP2, otra proteína asociada a microtúbulos y relacionada con tau. Hemos descrito una caída en sus niveles, un desbalance en sus isoformas y una localización subcelular aberrante en EH. En modelos celulares este splicing puede ser ejecutado por SRSF6 (Brain Pathol. 27(2):181-189).

La alteración del splicing en EH ha abierto una nueva línea de investigación en la que trabajamos actualmente.

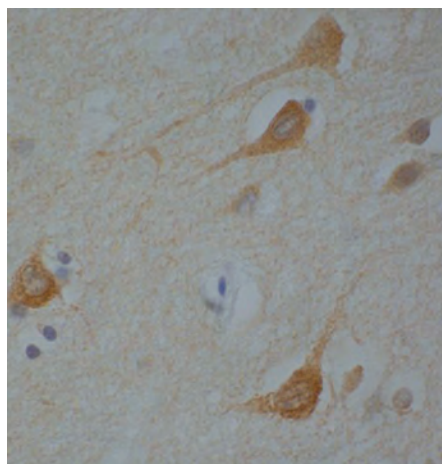


Figura 1. Ejemplo de TNRs.

Figure 1. TNRs example.

Research summary

Huntington's disease (HD) is the most prevalent genetic neurodegenerative disease, caused by an expansion of the trinucleotide CAG located in 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. This way, we discovered an isoform imbalance in tau, a protein related with Alzheimer's disease and other dementias, and a new histopathological hallmark (the Tau Nuclear Rods or TNRs), consisting on the presence of tau in nuclear indentations, in HD. Furthermore, the splicing factor SRSF6, involved in tau splicing and capable to binding CAG-repeats, is altered in HD and sequestered in the mutant huntingtin inclusion bodies (Nat Med. 2014, 20(8):881-5).

In order to characterize if tau alteration is enough for TNR appearance, we have tested a mouse model of FTDP17, a disease caused by altered tau. The TNR appearance in this model let us conclude that TNR detection could be useful as marker of tau imbalance (Brain Pathol. doi: 10.1111/bpa.12407).

We have also described decreased GSK3b, a kinase able to phosphorylate tau, in HD. Disease phenotype is reversible with GSK3b overexpression in an HD model (HMG 24(17): 5040-5052).

As well, we have studied levels and isoforms of MAP2, another microtubule-associated protein which is related to tau. Its levels drop, its isoforms are imbalanced and its subcellular localization is aberrant in HD. In cell models, this splicing can be performed by SRSF6 (Brain Pathol. 27(2):181-189).

These splicing alterations in HD have opened a new research line in which we are currently working in our lab.

Publicaciones / Publications

Etcheto, M; Junyent, F; de Lemos, L; Pallas, M; Folch, J; Beas-Zarate, C; Verdaguer, E; Gómez-Sintes, R; Lucas, JJ; Auladell, C; Camins, A. (2015) Mice lacking functional fas death receptors are protected from kainic acid-induced apoptosis in the hippocampus. *Molecular Neurobiology* **52**: 120-129.

Fernández-Nogales, M; Hernández, F; Miguez, A; Alberch, J; Ginés, S; Pérez-Navarro, E; Lucas, JJ. (2015) Decreased glycogen synthase kinase-3 levels and activity contribute to Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* **24**: 5040-5052.

Sorolla, M.A., Rodríguez-Colman, M.J., Vall-Iaura, N., Vived, C., Fernández-Nogales, M., Lucas, J.J., Ferrer, I., Cabiscol, E. (2015) Impaired PLP-dependent metabolism in brain samples from Huntington disease patients and transgenic R6/1 mice. *Metabolic Brain Disease*, pp. 1-8.

McKinnon, C., Goold, R., Andre, R., Devoy, A., Ortega, Z., Moonga, J., Linehan, J.M., Brandner, S., Lucas, J.J., Collinge, J., Tabrizi, S.J. (2016) Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin-proteasome system. *Acta Neuropathologica*, **131**, pp. 411-425.

Hernández-Ortega K, García-Esparcia P, Gil L, Lucas JJ, Ferrer I. (2016) Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol.* **26**:593-605

Cabrera JR, Lucas JJ. MAP2 Splicing is Altered in Huntington's Disease. (2016). *Brain Pathol.* **27**:181-189.

Fernández-Nogales M, Santos-Galindo M, Merchán-Rubira J, Hozemans JJ, Rábano A, Ferrer I, Avila J, Hernández F, Lucas JJ. (2016) Tau-positive nuclear indentations in P301S tauopathy mice. *Brain Pathol.*

Fernández-Nogales M, Santos-Galindo M, Hernández IH, Cabrera JR, Lucas JJ. (2016) Faulty splicing and cytoskeleton abnormalities in Huntington's disease. *Brain Pathol.* **26**:772-778. Review.

de Diego-García L, Ramírez-Escudero M, Sebastián-Serrano Á, Díaz-Hernández JI, Just JP, Lucas JJ, Díaz-Hernández M. (2016) Regulation of proteasome activity by P2Y2 receptor underlies the neuroprotective effects of extracellular nucleotides. *Biochim Biophys Acta.* **1863**:43-51.

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>.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Marta Fernández Nogales (2015) Papel de GSK-3 y tau en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. Universidad Autónoma de Madrid. José Javier Lucas Lozano.



Figura 2. Isoformas de MAP2 en EH según datos RNAseq.

Figure 2. MAP2 isoforms according to RNAseq data.

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Marta Pereira Pereira
Silvia García López

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Anna Nelke

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Raquel de Andrés Hernáiz
María Bueno Tarodo
Alba Gutiérrez Seijo
Elisa Maggi
Rebeca Martínez Lázaro
Beatriz Sánchez Pintado
Petra Terešák
Pilar Santos Joven

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. Los fármacos disponibles alivian algunos síntomas en etapas iniciales de la enfermedad, pero no la curan ni enlentecen, al no frenar la atrofia o muerte neuronal.

La investigación en biología de células troncales humanas es de gran interés, para retrasar la progresión o curar estas enfermedades. En nuestro grupo estamos interesados en: 1) Células troncales neurales (NSCs), propias de tejido nervioso; 2) Células troncales derivadas de la masa celular interna del blastocisto ("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 interesan 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 (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, bioimplantes controlables desde el exterior y terapéuticos, 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.

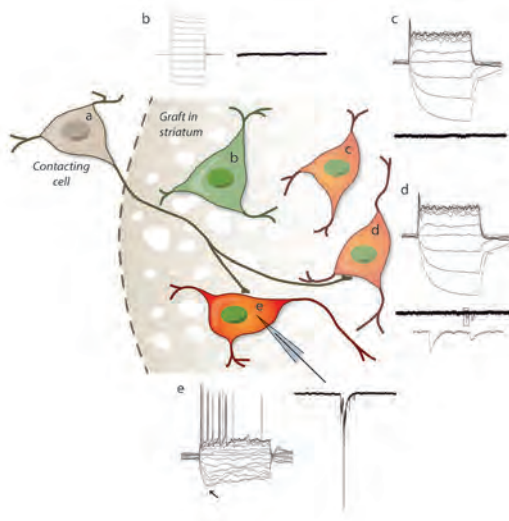


Figura 1. Esquema de las neuronas derivadas de hNSCs de mesencéfalo ventral microtrasplantadas en secciones de estriado, y su maduración bioquímica e integración funcional, a las seis semanas tras el implante:

(a) Célula del huésped que contacta con las células trasplantadas. (b) Célula humana trasplantada inmadura GFP+ que no recibe señales de la células del huésped y no muestra ningún potencial de acción (AP). Se registraron un total de 26 células con este fenotipo. (c) Células madurando que empiezan a expresar el enzima Tirosina Hidroxalasa (TH, limitante para la síntesis de dopamina) y muestra APs muy inmaduros, no recibiendo señales del huésped. Se registraron un total de 12 células con este fenotipo. (d) Células madurando que expresan TH y reciben señales del huésped. Se registraron un total de 4 células con este fenotipo. (e) Células maduras e integradas funcionalmente, expresando TH, que muestran los trenes de AP característicos de neuronas dopaminérgicas maduras, incluyendo el componente típico denominado "sag" (flecha). Se registraron un total de 3 células con este fenotipo.

Figure 1. Schematics of ventral mesencephalic hNSCs (hVM1 cell line) derived grafted cells showing different integration and biochemical and electrophysiological maturation rates coexisting six weeks post-grafting onto striatal organotypic slices:

(a) Contacting cell. (b) Immature GFP+ grafted human cells do not receive inputs from the contacting cell and do not show any action potential (AP). A total of 26 cells with this phenotype were recorded. (c) Maturing human grafted cell starts expressing Tyrosine Hydroxylase (TH) and shows a very immature AP but is not receiving any input from contacting cells either. A total of 12 cells with this phenotype were recorded. (d) Maturing cell expressing TH shows an immature AP and receives inputs from contacting cells. A total of four cells with this phenotype were recorded. (e) Integrated cell expressing TH shows characteristic dopaminergic action potentials with sag component (arrow). A total of three cells with this phenotype were recorded.

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 delay or 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 the 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 focuses 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 of stem cells 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 (CRISPR/Cas9), development of nanotools to study hNSCs biology in vitro and in vivo, externally controllable bioimplants, 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

Erichsen JL, Blaabjerg M, Bogetoft H, Serrano AM and Meyer M (2015) Group I metabotropic Glutamate Receptors: A potential target for regulation of proliferation and differentiation of human neural stem cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2015 Apr; **116**:329-36.

González-Sánchez H.M., Monsivais-Urenda A, Salazar-Aldrete C.A., Hernández-Salinas A., Noyola D.E., Jiménez-Capdeville M.E., Martínez-Serrano A., Castillo C.G. (2015) Effects of cytomegalovirus infection in human neural precursor cells depend on their differentiation state. *J. Neurovirol.* **21**:346-57.

Pino-Barrio MJ, García-García E, Menéndez P and Martínez-Serrano A (2015) V-myc immortalizes human neural stem cells in the absence of pluripotency-associated traits. *PLoS One*, **10**:e0118499.

Ramos-Gómez M., Seiz Emma G. and Martínez-Serrano A (2015) Optimization of the Magnetic labeling of human neural stem cells and MRI visualization in the hemiparkinsonian rat brain. *J. Nanobiotechnology*, **13**, 20.

Daviaud N., Garbayo E., Sindji L., Martínez-Serrano A., Schiller P.C. and Montero-Menei CN (2015) Survival, differentiation, and neuroprotective mechanisms of human stem cells complexed with Neurotrophin-3 releasing pharmacologically active microcarriers in an ex vivo model of Parkinson's disease. *Stem Cells Transl. Med.*, **4**:670-84.

Ramos-Gómez M. and Martínez-Serrano A. (2016) Tracking of iron-labeled human neural stem cells by magnetic resonance imaging in cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, **11**. 49-25.

Martínez-Serrano A, Pereira MP, Avaliani N, Nelke A, Kokaia M and Ramos-Moreno T (2016) Short-term grafting of human neural stem cells: electrophysiological properties and motor behavioral amelioration in experimental Parkinson's disease. *Cell Transplantation*, **25**:2083-2097.

Patentes / Patents

Martínez Serrano A., Liste I., Ramos Gómez M., Seiz E.G., Courtois E.T.C., Moreno Moreno B., García López S., Pérez Pereira M. "Método para inducir un aumento en la génesis de neuronas dopaminérgicas en una población celular de células troncales fetales o adultas obtenidas de un mamífero". P201531576. España. 3 noviembre 2015. UAM.

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 González
Pilar Rodríguez-Pombo
Eva María Richard Rodríguez
Alejandra Gámez Abascal

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Sandra Arduim Brasil

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Celia Medrano Rodríguez
Alfonso Oyarzábal Sanz
(Hasta agosto 2016)
Patricia Yuste Checa
(Hasta junio 2016)

Irene Bravo Alonso
Alvaro Briso-Montiano Pastrana
Ainhoa Martínez Pizarro
Ana Rivera Barahona

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Isabel Manso Gavilán

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Esmeralda Alonso Barroso
Laura Arribas
Alejandro Fulgencio
Diana Gallego Martínez
Pedro Martínez Fleta
Paula Contonente

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Julia Mugnaini
(CEMECO, Córdoba, Argentina)

Resumen de investigación

El grupo pertenece al CIBER de Enfermedades Raras y al Instituto de Investigación Sanitaria IdiPAZ. En este periodo hemos logrado avances importantes en el desarrollo y aplicación de técnicas de secuenciación masiva, en el conocimiento de la implicación de la mitocondria y los miRNAs en la fisiopatología, en la generación de iPSc a partir de fibroblastos de pacientes como modelos de enfermedad, en la identificación de chaperonas farmacológicas y en la aplicación de la terapia antisentido moduladora de splicing.

La secuenciación masiva se ha confirmado como una herramienta diagnóstica rápida y de alta sensibilidad, que en combinación con la información clínica y bioquímica nos ha permitido genotipar pacientes con síntomas clínicos solapantes. En el estudio de la fisiopatología en fibroblastos de pacientes y en modelos murinos hemos confirmado la disfunción mitocondrial y la alteración en la homeostasis redox subyacente a varias enfermedades (Fig. 1), incluida una forma de autismo tratable. Estos resultados indican que el daño oxidativo contribuye a la fisiopatología multiorgánica y sienta las bases para la evaluación terapéutica de compuestos antioxidantes y potenciadores de la función mitocondrial. Por otra parte, se han identificado una serie de miRNAs desregulados en el modelo murino de acidemia propiónica y en plasma de pacientes, miRNAs que regulan vías de señalización de estrés, neurodegeneración y cardiopatías, indicando su implicación fisiopatológica y su potencial como biomarcadores. Hemos analizado el efecto de mutaciones de tipo *missense* 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 esta enfermedad. Varios de estos compuestos se han patentado. Asimismo, hemos confirmado la eficacia *in vitro* de la terapia antisentido para mutaciones de splicing en diferentes genes.

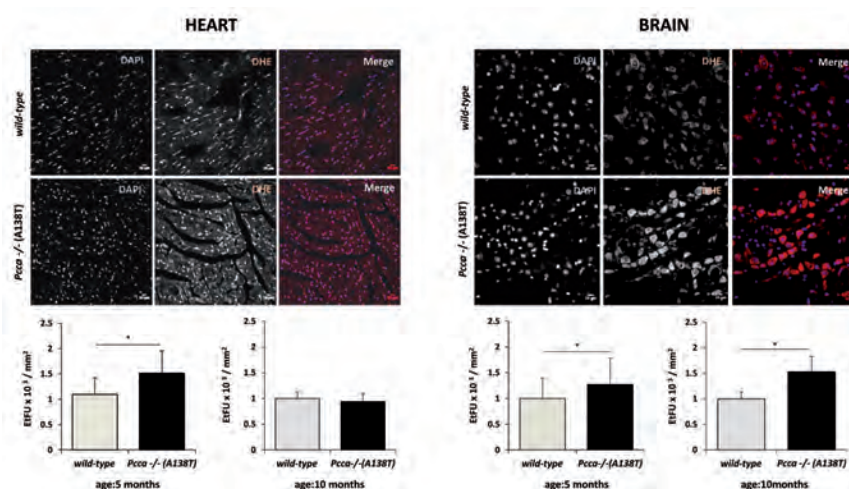


Figura 1. Medida de estrés oxidativo (producción de anión superóxido) mediante tinción con DHE en cortes de corazón y cerebro del ratón modelo de acidemia propiónica (Gallego-Villar et al. 2016).

Figure 1. Measurement of oxidative stress (superoxide production) in heart and brain sections of the propionic acidemia mouse model by DHE staining (Gallego-Villar et al. 2016).

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). In this period we have accomplished significant achievements in the development and application of next generation sequencing techniques, in the research of the role of mitochondria and miRNAs in the pathophysiology, in the generation of iPSc from patients' fibroblasts as cellular models of disease, in the identification of pharmacological chaperones and in the application of antisense therapy for splicing defects.

We have confirmed that next-generation sequencing is a rapid and accurate tool which, in combination with the biochemical and clinical data, provides an effective means of genotyping patients with overlapping clinical symptoms. In the study of the pathophysiology, using patients' fibroblasts and murine models, we have shown an altered redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in several diseases (Fig.1), including a treatable form of autism. The results indicate that oxidative damage contributes to the multiorganic physiopathology and provides the basis for the therapeutic evaluation of antioxidants and mitochondrial biogenesis potentiators. In addition, we have identified dysregulated miRNAs in the mouse model of propionic acidemia and in patients' plasma samples, miRNAs involved in stress signalling, cardiomyopathies and neurodegeneration, indicating their involvement in the pathophysiology and their biomarker potential. We have analysed the effect of missense mutations in a congenital defect of glycosylation (PMM2-CDG), revealing a folding and stability defect, leading to the search and identification of pharmacological chaperones to treat this disease. Several compounds have been patented. In addition, we have confirmed the efficacy in vitro of antisense therapy for splicing defects in several genes.

Publicaciones / Publications

Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Cuevas-Martín C, Guenzel A, Pérez B, Barry MA, Murphy MP, Logan A, Gonzalez-Quintana A, Martín MA, Medina S, Gil-Izquierdo A, Cuezva JM, Richard E and Desviat LR (2016) In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder. *Free Radic. Biol. Med.* **96**:1-12.

Vega AI, Medrano C, Navarrete R, Desviat LR, Merinero B, Rodríguez-Pombo P, Vitoria I, Ugarte M, Pérez-Cerdá C and Pérez B (2016) Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genet. Med.* **18**(10):1037-43.

Martínez-Pizarro A, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B and Richard E. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Homocystinuria Patients with Remethylation Defects. *PLoS One.* **11**(3):e0150357.

Oyarzabal A, Bravo-Alonso I, Sánchez-Aragó M, Rejas MT, Merinero B, García-Cazorla A, Artuch R, Ugarte M and Rodríguez-Pombo P. (2016) Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive dietary response in this form of autism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1862**(4):592-600.

Bravo-Alonso I, Oyarzabal A, Sánchez-Aragó M, Rejas MT, Merinero B, García-Cazorla A, Artuch R, Ugarte M and Rodríguez-Pombo P (2016) Dataset reporting BCKDK interference in a BCAA-catabolism restricted environment. *Data in Brief.* **7**:755-9.

Ortigoza-Escobar JD, Molero-Luis M, Arias A, Martí-Sánchez L, Rodríguez-Pombo P, Artuch R and Pérez-Dueñas B. (2016) Treatment of genetic defects of thiamine transport and metabolism. *Expert. Rev. Neurother.* **16**(7):755-63.

Aldámiz-Echevarría L, Liarena M, Bueno MA, Dalmáu J, Vitoria I, Fernández-Marmiesse A, Andrade F, Blasco J, Alcalde C, Gil D, García MC, González-Lamuño D, Ruiz M, Ruiz MA, Peña-Quintana L, González D, Sánchez-Valverde F, Desviat LR, Pérez B and Couce ML. (2016) Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4 responsiveness in Spanish patients with phenylketonuria. *J. Hum. Genet.* **61**(8):731-44.

Ortigoza-Escobar JD, Oyarzabal A, Montero R, Artuch R, Jou C, Jiménez C, Gort L, Briones P, Muchart J, López-Gallardo E, Emperador S, Pesini ER, Montoya J, Pérez B, Rodríguez-Pombo P and Pérez-Dueñas B. (2016) Ndufs4 related Leigh syndrome: A case report and review of the literature. *Mitochondrion.* **28**:73-8.

Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, Grkovic S, Kostic J, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR, Pavlovic S and Perez B. (2016) Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias *Clin. Genet.* **90**(3):252-7.

Ortigoza-Escobar JD, Molero-Luis M, Arias A, Oyarzabal A, Darín N, Serrano M, García-Cazorla A, Tondo M, Hernández M, García-Villoria J, Casado M, Gort L, Mayr JA, Rodríguez-Pombo P, Ribes A, Artuch R and Pérez-Dueñas B (2016) Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome. *Brain.* **139**(Pt 1):31-8.

Vitoria I, Martín-Hernández E, Peña-Quintana L, Bueno M, Quijada-Fraile P, Dalmáu J, Molina-Marrero S, Pérez B and Merinero B. (2015) Carnitine-Acylcarnitine Translocase Deficiency: Experience with Four Cases in Spain and Review of the Literature. *J. Inher. Metab. Dis.* **20**:11-20.

Rivera-Barahona A, Sánchez-Alcudia R, Vicielli HM, Rüfenacht V, Pérez B, Ugarte M, Häberle J, Thöny B and Desviat LR. (2015) Functional Characterization of the spf/ash Splicing Variation in OTC Deficiency of Mice and Man. *PLOS One* **10**:e0122966.

Yuste-Checa P, Gámez A, Brasil S, Desviat LR, Ugarte M, Pérez-Cerdá C and Pérez B. (2015) The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein. *Hum. Mutat.* **36**:851-860.

Matos L, Gonçalves V, Pinto E, Laranjeira F, Prata MJ, Jordan P, Desviat LR, Pérez B and Alves S. (2015) Functional analysis of splicing mutations in the IDS gene and the use of antisense oligonucleotides to exploit an alternative therapy for MPS II. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**:2712-272.

Matos L, Gonçalves V, Pinto E, Laranjeira F, Prata MJ, Jordan P, Desviat LR, Pérez B and Alves S.(2015) Data in support of a functional analysis of splicing mutations in the IDS gene and the use of antisense oligonucleotides to exploit an alternative therapy for MPS II. *Data in Brief* **28**:5:810-7.

Serrano M, de Diego V, Muchart J, Cuadras D, Felipe A, Macaya A, Velázquez R, Poo MP, Fons C, O'Callaghan MM, García-Cazorla A, Boix C, Robles B, Carratalá F, Girós M, Briones P, Gort L, Artuch R, Pérez-Cerdá C, Jaeken J, Pérez B and Pérez-Dueñas B. (2015) Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**:138.

Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Kecman B, Ugrin M, Zukic B, Desviat LR, Pavlovic S and Perez B. (2015) Tetrahydrobiopterin deficiency among Serbian patients presenting with hyperphenylalaninemia. *J. Pediatr. Endocrinol. Metabol.* **28**:477-480.

Yuste-Checa P, Medrano C, Gámez A, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Pérez-Cerdá C and Pérez B (2015) Antisense-Mediated Therapeutic Pseudoexon Skipping In TMEM165-CDG. *Clin. Genet.* **87**:42-8.

Brasil S, Richard E, Jorge-Finnigan A, Leal F, Merinero B, Banerjee R, Desviat LR, Ugarte M and Pérez B. (2015) Methylmalonic aciduria cblB type: characterization of two novel mutations and mitochondrial dysfunction studies. *Clin. Genet.* **87**:576-81.

Richard E, Perez B, Perez-Cerdá C and Desviat LR. (2015) Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies. *Expert Opin. Orphan Drugs* **3**:1427-1438.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alfonso Oyarzábal (2016). Del gen a la fisiopatología. Nuevas enfermedades asociadas al catabolismo de los aminoácidos ramificados. UAM. Directora: P. Rodríguez-Pombo.

Patricia Yuste Checa (2016). Desarrollo de terapias específicas de mutación en enfermedades metabólicas hereditarias. UAM. Directora: B. Pérez.

Lorena Gallego-Villar (2015). Estudios genéticos, fisiopatológicos y con oligonucleótidos antisentido en enfermedades neurometabólicas. UAM. Directoras: E. Richard y L. Ruiz Desviat.

Patentes / Patents

B. Pérez, A. Gámez, P. Yuste, S. Brasil, M. Ugarte A. Martínez, J. Underhaug. Compounds for treating congenital disorders of Glycosylation. Nº de solicitud: EP16382373.5. País de prioridad: Europa. Fecha de prioridad: 2016. Entidad titular: Universidad Autónoma de Madrid.

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
(Hasta septiembre 2015)

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Carlos B. Rueda Díaz
(Hasta junio 2015)
Paloma González Sánchez
Paula Martínez Valero
Carmen Rubio Caballero
Inés Juaristi Santos

Irene Pérez Liébana
(Desde enero 2016)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Bárbara Sesé Cobos
Isabel Manso Gavilán

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Guillermo Puertas Frías
Zulema Díaz López
Alba Bellido Altuna
Belén Caballero Albacete
Manuela Gagliano
Luis González Moreno
Ainhoa Gómez González
Cristina Campillo

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Araceli del Arco Martínez
(Universidad de Castilla-La Mancha)

Resumen de investigación

El principal objetivo de nuestro trabajo durante este período fue descubrir el papel del calcio (Ca^{2+}) en el control de la respiración mitocondrial en neuronas o en líneas neuronales intactas. Cualquier señal de Ca^{2+} va a causar un aumento en la carga de trabajo de la célula al activarse mecanismos para restaurar los niveles de Ca^{2+} en reposo, mecanismos que consumen ATP. De hecho, encontramos que cada señal de Ca^{2+} estimula la respiración acoplada, aumentando así la producción de ATP. Sin embargo, el Ca^{2+} tiene una forma adicional de estimular la respiración mediante la activación de las deshidrogenasas dependientes de Ca^{2+} de la matriz mitocondrial, un proceso dependiente del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), y/o mediante la activación del metabolismo mitocondrial a través de los transportadores de metabolitos en la membrana mitocondrial regulados por Ca^{2+} extramitocondrial. Hemos utilizado neuronas derivadas de ratones que carecen de diferentes transportadores de metabolitos mitocondriales regulados por Ca^{2+} para entender su papel en la respiración celular. De forma inesperada, nuestros resultados han sugerido un papel importante de uno de estos transportadores, Aralar/AGC1/Slc25a12, el intercambiador de aspartato/glutamato mitocondrial y componente de la lanzadera de NADH malato-aspartato (MAS), en la regulación de la respiración neuronal; Especialmente en comparación con el papel aparente del MCU, requerido para incrementar los niveles de Ca^{2+} en la matriz. También hemos estudiado las respuestas a diferentes tipos de señales de Ca^{2+} , particularmente glutamato y excitotoxicidad, y el papel en cerebro de los transportadores mitocondriales regulados por Ca^{2+} , el de $\text{ATP-Mg}^{2+}/\text{Pi}$ (SCaMC-3/Slc25a23) y Aralar sobre estas respuestas. Paradójicamente, mientras que Aralar/MAS es dispensable en la excitotoxicidad *in vitro* por glutamato, juega un papel importante en la protección por lactato de la excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, SCaMC-3 ejerce un papel protector en los procesos de excitotoxicidad aumentando el contenido de nucleótidos de adenina en la matriz, que dificulta la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP).

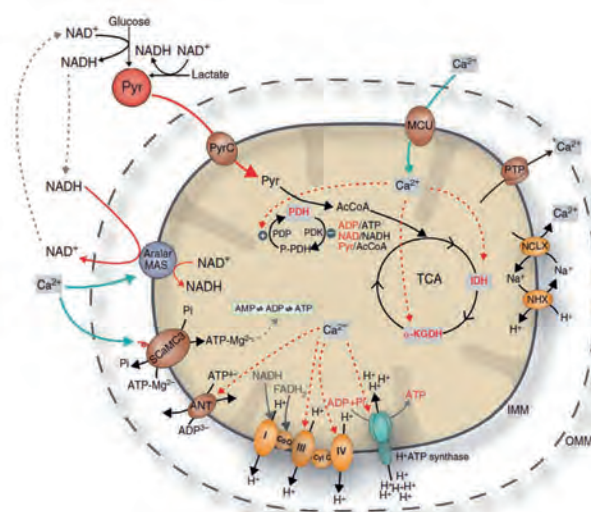


Figura 1. Regulación por Ca^{2+} de la respiración mitocondrial.

En la mitocondria, las deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (IDH, α -KGDH y PDH) son sensibles a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$. Los complejos respiratorios IV y III también pueden estar regulados por Ca^{2+} intramitocondrial. Los niveles de Ca^{2+} en la matriz pueden regular los procesos OXPHOS afectando a la ATP/ADP translocasa (ANT) y la F1F0-ATP sintasa. El Ca^{2+} extramitocondrial activa la actividad transportadora de Aralar/AGC1-MAS y SCaMC-3.

Figure 1. Ca^{2+} regulation of mitochondrial respiration. In mitochondria, tricarboxylic acid cycle dehydrogenases (IDH, α -KGDH and PDH) are activated by changes in $[\text{Ca}^{2+}]$. Complex IV and complex III may also be regulated by intramitochondrial Ca^{2+} . Matrix Ca^{2+} may also regulate OXPHOS through an effect on the ATP/ADP translocase (ANT) and on the F1F0-ATP synthase. Extramitochondrial Ca^{2+} activates Aralar/AGC1-MAS activity and SCaMC-3.

Research summary

The main goal pursued during this time period was to discover the role of calcium (Ca^{2+}) in the control of mitochondrial respiration in intact neurons or neuron-like cells. Any Ca^{2+} signal will cause an increase in cell workload by triggering mechanisms to restore resting Ca^{2+} , mechanisms which use up ATP. In fact, we found that every Ca^{2+} signal stimulates coupled respiration, increasing ATP production. However, Ca^{2+} has an additional way to stimulate respiration which involves matrix Ca^{2+} -activation of mitochondrial dehydrogenases, a process dependent on the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU), and/or activation of mitochondrial metabolism through metabolite transporters in the mitochondrial membrane regulated by extramitochondrial Ca^{2+} . We have used neurons derived from mice lacking different proteins involved in Ca^{2+} -regulated metabolite transport to understand their role in cell respiration. Quite unexpectedly, our results suggested a major role of one of these transporters, Aralar/AGC1/Slc25a12, the mitochondrial aspartate/glutamate exchanger and component of the malate-aspartate NADH shuttle (MAS), in regulating neuronal respiration; especially as compared to the apparent role of the MCU, required for increases in matrix Ca^{2+} . We have also studied the responses to different types of Ca^{2+} signals, particularly glutamate and excitotoxicity, and the role of the brain Ca^{2+} -regulated mitochondrial carriers, that of ATP-Mg/Pi (SCaMC-3/Slc25a23) and Aralar on these responses. Paradoxically, while Aralar/MAS was dispensable in *in vitro* glutamate excitotoxicity, it played an important role in lactate protection *in vitro* and *in vivo* excitotoxicity. However, SCaMC-3 exerted a protective role in excitotoxicity by increasing the matrix content of adenine nucleotides, which opposes mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening.

Publicaciones / Publications

Cascón, A., Comino-Méndez, I., Currás-Freixes, M., de Cubas, A.A., Contreras, L., Richter, S., Peitzsch, M., Mancikova, V., Inglada-Pérez, L., Pérez-Barrios, A., Calatayud, M., Azriel, S., Villar-Vicente, R., Aller, J., Setién, F., Moran, S., García, J.F., Río-Machín, A., Letón, R., Gómez-Graña, A., Apellániz-Ruiz, M., Roncador, G., Esteller, M., Rodríguez-Antona, C., Satrustegui, J., Eisenhofer, G., Urioste, M., Robledo, M. (2015) Whole-Exome Sequencing Identifies MDH2 as a New Familial Paranglioma Gene. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**.

Rueda, C.B., Traba, J., Amigo, I., Llorente-Folch, I., González-Sánchez, P., Pardo, B., Esteban, J.A., del Arco, A. and Satrustegui, J. (2015) Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCaMC-3/Slc25a23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons. *J. Neurosci.* **35**, 3566-3581.

Llorente-Folch, I., Rueda, C.B., Pardo, B., Szabadkai, G., Duchon, M.R. and Satrustegui, J. (2015) The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *J. Physiol.* **593**, 3447-3462.

Satrustegui, J. and Bak, L.K. (2015) Fluctuations in Cytosolic Calcium Regulate the Neuronal Malate-Aspartate NADH Shuttle: Implications for Neuronal Energy Metabolism. *Neurochem. Res.* **40**, 2425-2430.

Contreras, L. (2015) Role of AGC1/aralar in the metabolic synergies between neuron and glia. *Neurochem. Int.* **88**, 38-46.

García-Bermúdez, J., Sánchez-Aragó, M., Soldevilla, B., Del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C. and Cuezva, J.M. (2015) PKA phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H(+)-ATP synthase. *Cell Rep.* **12**, 2143-2155.

Du, J., Rountree, A., Cleghorn, W.M., Contreras, L., Lindsay, K.J., Sadilek, M., Gu, H., Djukovic, D., Raftery, D., Satrustegui, J., Kanow, M., Chan, L., Tsang, S.H., Sweet, I.R. and Hurley, J.B. (2016) Photo-transduction influences metabolic flux and nucleotide metabolism in mouse retina. *J. Biol. Chem.* **291**, 4698-4710.

Santacatterina, F., Sánchez-Cenizo, L., Formentini, L., Mobasher, M.A., Casas, E., Rueda, C.B., Martínez-Reyes, I., de Arenas, C.N., García-Bermúdez, J., Zapata, J.M., Sánchez-Aragó, M., Satrustegui, J., Valverde, Á.M. and Cuezva, J.M. (2015) Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state. *Oncotarget* **7**, 490-508.

Salamanca, A., Bárcena, B., Arribas, C., Fernández-Agulló, T., Martínez, C., Carrascosa, J.M., Ros, M., Andrés, A. and Gallardo, N. (2015) Aging impairs the hepatic subcellular distribution of ChREBP in response to fasting/feeding in rats: Implications on hepatic steatosis. *Exp. Gerontol.* **69**, 9-19.

Llorente-Folch, I., Rueda, C.B., Perez-Liebana, I., Satrustegui, J. and Pardo, B. (2016) L-Lactate-Mediated Neuroprotection against Glutamate-Induced Excitotoxicity Requires Aralar/AGC1. *J. Neurosci.* **36**, 4443-4456.

del Arco, A., Contreras, L., Pardo, B. and Satrustegui, J. (2016) Calcium regulation of mitochondrial carriers. *BBA-Mol. Cell Res.* **1863**, 2413-2421, special issue "Channels and transporters in cell metabolism".

Rueda, C.B.; Llorente-Folch, I.; Traba, J.; Amigo, I., González-Sánchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martínez-Valero, P., Pardo, B., del Arco, A. and Satrustegui, J. (2016) Glutamate excitotoxicity and Ca^{2+} -regulation of respiration: Role of the Ca^{2+} activated mitochondrial transporters (CaMCs). *BBA-Bioenergetics* **1857**, 1158-1166.

Contreras, L., Ramírez, L., Du, J., Hurley, J.B., Satrustegui, J. and de la Villa, P. (2016) Deficient glucose and glutamine metabolism in Aralar/AGC1/Slc25a12 knockout mice contributes to altered visual function. *Molecular Vision* **22**, 1198-1212.

Sierra Rojas, J.X., García-San Frutos, M., Horrillo, D., Lauzurica, N., Oliveros, E., Carrascosa, J.M., Fernández-Agulló, T. and Ros, M. (2016) Differential Development of Inflammation and Insulin Resistance in Different Adipose Tissue Depots Along Aging in Wistar Rats: Effects of Caloric Restriction. *J. Gerontol. A Biol Sci Med Sci.* **71**, 310-322.

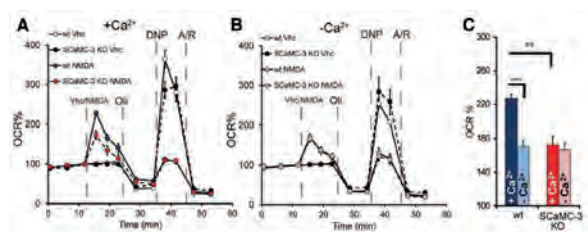


Figura 2. Neuronas deficientes en SCaMC-3 tienen menor estimulación de la respiración tras la exposición a NMDA.

(A, B) Perfil de consumo de oxígeno (OCR) en neuronas de corteza de ratones WT y SCaMC-KO en presencia (A) o ausencia (B) en el medio de 2 mM Ca^{2+} en las condiciones indicadas. En el gráfico se muestra la adición secuencial de NMDA/vehículo (Veh) y los inhibidores metabólicos: oligomycin (Oli, 6 μM), 2,4-dinitrofenol (DNP, 0.5 mM) y antimicina A/rotenona (A/R, 1 μM /1 μM). (C) Cuantificación de la estimulación de la respiración tras la adición de NMDA 100 μM , indicada como porcentaje del nivel basal, en los experimentos mostrados en los paneles A y B.

Figure 2. SCaMC-3-deficient neurons show decreased respiratory stimulation upon NMDA exposure.

(A, B) Profiles of oxygen consumption rate (OCR) in cortical neurons from WT and SCaMC-KO mice in the presence (A) or absence (B) of 2 mM Ca^{2+} medium at the indicated conditions. The sequential injection of NMDA/vehicle (Veh) and metabolic inhibitors: oligomycin (Oli, 6 μM), 2,4-dinitrophenol (DNP, 0.5 mM) and antimycin A/rotenone (A/R, 1 μM /1 μM) is indicated. (C) Stimulation of respiration upon 100 μM NMDA addition (indicated as a percentage of basal values) in experiments showed in A and B panels.

Mecanismos moleculares de neurogeneración

Molecular mechanisms of neurodegeneration



Jefe de Línea / Group Leader:
Francisco Wandosell Jurado

Personal Científico / Scientific Staff:
María José Pérez Álvarez
Beatriz Cubelos
(Responsable Proyecto / Project Leader)

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:
Lara Ordóñez Gutiérrez (CIBERNED)
Jorge Cabrera (2010-2014)

Becarios Predoctorales / Graduate Students:
Irene Benito Cuesta
Miriam Sanz Rodríguez

Estudiantes / Undergraduate Students:

Carlota Gil Martín (2015-2016)
Mario Villa (2015-2016, 2016-2017)
Juan Escudero Ramírez (2016-2017)
Alazne Arrasola Sastre (2016-2017)
Laura Clavain Matero (02/2016-07/2016)
Mariah Berne (07/2016)
Iván Fernández Pérez (2014-2015)

Científicos Visitantes / Visiting Scientists:
Adrián Posado Fernandez
Marie Curie ESR-(EXTRABRAIN ITN)
José Luis Herrera
IMBRAIN, Univ Tenerife/ Colaboración

Resumen de investigación

Nuestro grupo se denomina “Mecanismos Moleculares de Neurodegeneración” y es una línea establecida en el CBM desde hace ya algunos años. Nuestro grupo está interesado en una serie de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Isquemia cerebral o tumores cerebrales, mayoritariamente asociados con la edad.

Muchos datos apoyan la idea que la longevidad está controlada por vías genéricas, como, IGF1/Insulin-PI3K-Akt-FoxO. Describimos: el papel de elementos de la vía, PI3K clase I, Akt y GSK3 en la morfogénesis neuronal; que esta vía se modifica en Isquemia y que la acción neuroprotectora de estrógenos, en parte, es debido a PI3K/Akt. Que la actividad quinasa mTORC, por debajo de Akt, en neuronas regula, en parte, el proceso de autofagia; y que su disfunción puede ser un factor determinante en la generación y/o la degradación del péptido beta-amiloide, en Alzheimer.

En tercer lugar, estamos interesados en algunos elementos regulados por Akt (FoxO, Bim, β -catenin, YAP/TAZ), nuestros datos indicaron que son responsables, del control de la división de células troncales tumorales (CSC) y del mantenimiento de su fenotipo “troncal-tumoral”. Nuestro trabajo ahora se está centrando el estudio de la conversión astrocito-astrocitoma-glioma y qué elementos controlados por Akt podrían regula esta conversión; y como WIP regula este proceso tumoral en gliomas (Colaboracion Drs. I. M. Anton & F. Wandosell).

En estos momentos se ha incorporado como Project leader la Dr^a: Beatriz Cubelos, RyC, ella y su grupo están analizando el fenotipo de los ratones KO para RRas1 y RRas 2 en SNC, que entre otras características anómalas poseen mielinización anómala y una señalización deficiente en Akt.

Resumiendo, nos estamos centrando en la vía de señalización PI3K-Akt y en algunos de los elementos que controlan de la división de celular, y la diferenciación, en CNS y cómo de algunas de estas proteínas se modifican condiciones patológicas.

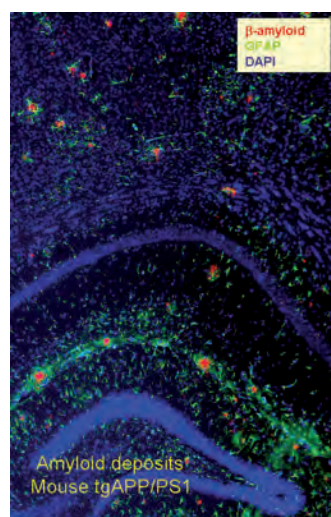


Figura 1. Sección sagital de un cerebro de ratón doble transgénico (APP/PS1) teñido con anticuerpos contra amiloide (rojo) y contra la proteína de glia GFAP (verde). La sección muestra depósitos de amiloide en regiones de Corteza e Hipocampo. La tinción azul representa los núcleos teñidos con DAPI.

Figure 1. Sagittal section from double transgenic mice APP/PS1 stained with antibodies against amyloid (red) and against the glia protein GFAP (Green). The section shows amyloid deposits in the Cortex and in the Hippocampus. The blue spots represent the nuclei DAPI stained.

Research summary

Our group, "Molecular mechanisms of Neurodegeneration", is a stablished line in the CBM over several years. Our group was interested in neurodegenerative disorders and now is focusing in a group of brain disorders associated with aging, such as Alzheimer's disease, Stroke and some type of brain tumours.

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. We defined the role of PI3K class I, GSK3 and Akt in the neuronal morphogenesis. We reported that this via is modified after Ischemia and that the neuroprotective role of estrogens, is due to the activation of PI3K-Akt pathway, at least in part.

Second, mTORC1, downstream Akt, controls in neurons, at least in part, autophagy; whereas its dysfunction has been considering a key factor of beta amyloid generation and/or degradation in Alzheimer's disease.

Third, we are analysing some Akt-downstream elements (such as FoxO, Bim, β -catenin, YAP/TAZ), 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 how WIP regulates actin cytoskeleton and glioma proliferation (Colaboration: Dr. I. Anton & F. Wandosell). The last year (2016) Dr^a: Beatriz Cubelos (RyC) has been incorporated as Project Leader in our lab. Dr^a B. Cubelos' group is currently analyzing the phenotype of RRas1 and RRas 2 knockout mice, which among other anomalous features have defect in myelination and a deficient signaling in Akt.

In summary, we are focusing on track PI3K-Akt signalling, analysing some elements that control physiological process, from cell division to differentiation in CNS, and how some of these proteins are modifying in pathology.

Publicaciones / Publications

del Puerto, A., Fronzaroli-Molinieres, L., Perez MJ., Giraud, P., Carlier, E., Wandosell, F., Debanne, D. and Garrido, JJ (2015) *Cerebral Cortex* **25**:2282-2294.

C. Vergara, L. Ordóñez-Gutiérrez, F. Wandosell, I. Ferrer, J.A. del Río, R. Gavín (2015). *Molecular Neurobiology* **51**:1206-20

Gargini, R., Cerliani, J.P., Escoll, M.I., Antón I.M. and Wandosell F (2015). *Stem Cells* **33**:646-60

Perez-Alvarez MJ., Mateos, L., Alonso, A., and Wandosell F. (2015). *Molecular Neurobiology* **52**:1690-1703.

Franco-Villanueva A., Wandosell F., and Anton I.M. (2015). *Brain and Behavior*, **5**-e00359.

Lara Ordóñez- Gutiérrez, Francesca Re, Erika Bereczki, Eniko Iojá, Maria Gregori, Alina J. Andersen, Marta Antón, S. Moein Moghimi, Jin-Jing Pei, Massimo Masserini and Francisco Wandosell (2014). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **11**: 421-30.

Cabrera, J.R., Viejo-Borbolla, A., Martínez-Martín, N., Blanco, S., Wandosell F., and Alcamí A., * (*Co-corresponding) (2015). *Plos Pathogens* **11**: e1004571.

Reginensi, D., Carulla, P., Nocentini, S., Seira, O., Serra-Picamal, X., Torres-Spin, A., Gavín, R., Flores, M.T., Wandosell, F., Samitier, J., Trepat, X., Navarro X., and del Río J.A. (2015) *Cell Mol Life Sci.* **72**:12719-37.

Perez-Alvarez M.J., and Wandosell F. (2016) *Curr Pharm Des.* **22**:1334-49.

Simona Mancini, Stefania Minniti, Maria Gregori, Giulio Sancini, Alfredo Cagnotto, Couraud Pierre-Olivier, Lara Ordóñez-Gutiérrez, Francisco Wandosell, Mario Salmons, Francesca Re (2015). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **12**, 43-52

S. Knafo, C. Sánchez-Puelles, E. Palomer, I. Delgado, J. E. Draffin, J. Mingo, T. Wahle, K. Kaleka, L. Mou, I. Pereda-Peréz, E. Klossi, E.B. Faber, H. I. M. Chapman, L. Lozano-Montes, A. Ortega-Molina, L. Ordóñez-Gutiérrez, F. Wandosell, J. Viña, C.G. Dotti, R. A. Hall, R. Pulido, N. Z. Gerges, A. M. Chan, M.R. Spaller, M. Serrano, C. Venero, J. A. Esteban (2015). *Nature Neuroscience* **19** - 3: 443 (NN-A48453B).

Rodríguez-Feo, J.A., Gallego-Delgado, J., Puerto, M., Wandosell, F. and Osende J., (2016). *BBA - Molecular Cell Research* **1863**: 1985-95.

Ordóñez-Gutiérrez, L., Antón, M. and Wandosell F. (2016) *Journal Alzheimer Disease* **54**, 645-656

Diez, H., Benítez, M.J., Fernández, S., Torres-Aleman, I., Garrido, J.J., and Wandosell F. (2016) *BBA-Molecular Cell Research* **1863**: 2574-83.

Mateos, L., Perez-Alvarez MJ and F Wandosell (2016) :BBA- *Molecular Basis of Disease* **1862**:1297-1308.

Cabrera, J.R., Viejo-Borbolla A., Alcamí A., *and Wandosell F.* (*Co-corresponding) *Journal of Neuroinflammation* Vol 13.

Gargini R., Escoll M.I., García, E., García-Escudero R., Wandosell, F. and I.M. Anton* (*Co-corresponding) (2016). *Cell Reports* **17**.

Ordóñez-Gutiérrez L., Posado-Fernández A., Ahmadvand D., Lettiero B., Wu L, Antón M., Flores, O., Moghimi SM., Wandosell F. (2016). *Biomaterials* In press.

Doan, R.N., Bae, B.I., Cubelos, B., Chang C., Hossain, A.A., Al-Saad, S., Mukaddes, N.M., Oner, O., Al-Saffar, M., Balkhy, S., Gascon G.G; Nieto, M., Walsh, C.A. (2016). *Cell*, **167**-341-354.

Otras actividades / Other activities

-Máster en Biología Molecular y Celular. Departamento de Biología Molecular (Ciencias) y Departamento de Bioquímica (Medicina) de la UAM (2014-2016.) 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) (2014-2017) Coordinadores: Dr. Javier Díaz Nido (Dpto. Biología Molecular UAM), Dr. Francisco Wandosell (CBMSO, CSIC-UAM).

-Máster en Neurociencia. Departamento de morfología. Módulo: "Vanguardia de la Neurociencia". Dr^a Beatriz Cubelos (2015-2016).

-V Curso de Formación Multidisciplinar en Demencias Neurodegenerativas Organiza Fundación CIEN/CIBERNED y UNED (Dpto. Psicología Básica I). Fundación CIEN. Fundación Reina Sofía. (9-13 Marzo, 2015) F. Wandosell.

-Docencia impartiendo las asignaturas de Neurobiología Molecular y Bioquímica experimental en el grado de Biología y Bioquímica respectivamente. Departamento de biología Molecular (UAM). Dr^a Beatriz Cubelos (2010-2017).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Lcda. Escoll Guerrero, M^a. Isabel "WIP MEDIA LA FUNCIÓN ONCOGÉNICA DE P53 MUTANTE". Universidad: Unv. Autónoma de Madrid. 21/07/2015; Sobresaliente Cum laude.



10 Grupos / 10 Groups

- | | | |
|-----|--|---|
| 150 | LUIS BLANCO DÁVILA | Mantenimiento y variabilidad del genoma: enzimología de la replicación y reparación de DNA
<i>Genome maintenance and variability: enzymology of DNA replication and repair</i> |
| 152 | LUIS CARRASCO LLAMAS | Bases Moleculares de la citopatología viral y fúngica
<i>Molecular bases of viral and fungal cytopathology</i> |
| 154 | CÉSAR DE HARO CASTELLA | Control traduccional de la respuesta al estrés en eucariotas
<i>Translation control of stress response in eukaryotes</i> |
| 156 | MARÍA GÓMEZ
VICENTEFRANQUEIRA | Organización funcional del genoma de mamíferos
<i>Functional organization of the mammalian genome</i> |
| 158 | CRISANTO GUTIÉRREZ | División celular, replicación del genoma y cromatina
<i>Cell division, genome replication and chromatin</i> |



Dinámica y Función del Genoma

Genome Dynamics and Function

- | | | |
|-----|--|---|
| 160 | ENCARNACIÓN
MARTÍNEZ-SALAS | Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos
<i>Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs</i> |
| 162 | JOSÉ MARÍA REQUENA
ROLANÍA | Regulación de la expresión génica en <i>Leishmania</i>
<i>Regulation of gene expression in Leishmania</i> |
| 164 | MARGARITA SALAS
FALGUERAS | Replicación del DNA del bacteriófago ø29
Virus de la peste porcina Africana
<i>Replication of bacteriophage ø29 DNA</i>
<i>African swine fever virus</i> |
| 166 | JOSÉ ANTONIO TERCERO
ORDUÑA | Control traduccional de la respuesta al estrés en eucariotas
<i>Translation control of stress response in eukaryotes</i> |
| 168 | MIGUEL DE VEGA JOSÉ | Grupo Reparación del DNA bacteriano
<i>Bacterial DNA repair</i> |

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
Sandra Chocrón Benloulou
Rubén Agudo Torres

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Guillermo Sastre Moreno
Patricia Alejandra Calvo Manzano
Gustavo Carvalho Diaz

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Susana Guerra González

Estudiantes /
Undergraduate Students:

Alberto Díaz Talavera
Antonio Lahera Alonso
Cristina Perpiñá Viciano

Científicos Visitantes /
Visiting Scientists:
Fabiana dos Santos Rando

Gestor de Investigación /
Administration manager:
Estefanía Martínez Jover

Resumen de investigación

En los últimos 15 años hemos estudiado Pol λ y Pol μ , dos DNA polimerasas implicadas en reparación de DSBs mediante NHEJ (ver Fig. 1). Hemos analizado la función de Pol λ y Pol μ mediante modelos celulares y murinos deficientes en una o en ambas enzimas, confirmando análisis previos y definiendo sus sustratos de reparación de DNA favoritos, demostrando así su papel complementario y no redundante en NHEJ (Pryor et al. PNAS 2015). Debido a la especificidad por sus sustratos específicos, Pol λ y Pol μ deben ser reguladas para su acceso selectivo a las roturas durante NHEJ. Recientemente, hemos demostrado que Pol λ se fosforila por ATM tras la inducción de DSBs, lo que incrementa su afinidad por el complejo DNA-PK /Ku, central en el proceso de NHEJ.

En 2013 nuestro grupo describió una nueva primasa/polimerasa (PrimPol) en células humanas, implicada en tolerancia al daño durante la replicación del DNA, y capaz de reiniciar cadenas de DNA bloqueadas. La obtención de un modelo murino deficiente en PrimPol, nos ha permitido estudiar la relevancia de esta segunda primasa *in vivo*, tanto en el núcleo como en la mitocondria. Los ratones carentes de PrimPol mostraron una respiración mitocondrial deficiente, obesidad al envejecer, pérdida de pelo, y defectos en el mantenimiento y número de copia del DNA mitocondrial.

La caracterización de *TthPrimPol*, en colaboración con Sygnis AG, nos permitió desarrollar un nuevo método de ampliación de DNA (TruePrime™), basado en la actividad DNA primasa de *TthPrimPol* (Picher et al. *Nat. Comm.* 2016), que ya está en el mercado (ver Fig. 2). Mediante técnicas de evolución dirigida, estamos explorando la capacidad de PrimPol humana para utilizar tanto NTPs como dNTPs, así como para copiar tanto moldes de DNA como RNA. Esta metodología será aplicada en colaboración con Sygnis para la mejora de *TthPrimPol*.

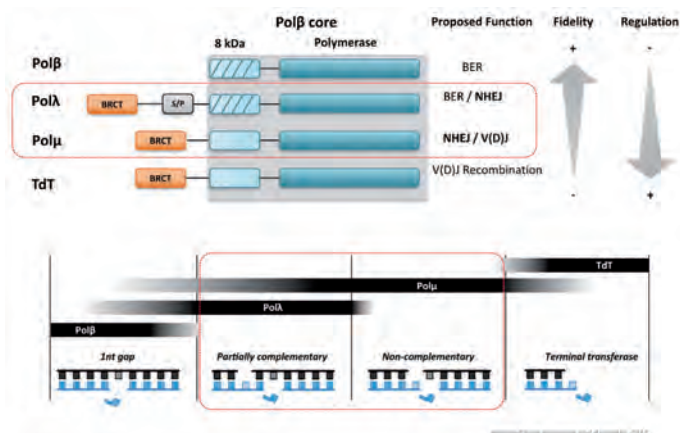


Figura 1. Los 4 miembros de la familia PolX contienen un core del tipo Pol β , si bien Pol β es la única que carece del dominio BRCT implicado en interacciones proteína:proteína. La fidelidad de cada enzima es proporcional a su grado de dependencia de molde, al contrario que su regulación. Las 4 polimerasas pueden llevar a cabo cortas reacciones de síntesis, aunque tienen sustratos favoritos: Pol β prefiere pequeños huecos o gaps, TdT extiende preferentemente extremos de DNA, mientras que Pol λ y Pol μ son capaces de insertar nucleótidos entre 2 extremos de DNA (una habilidad crucial para el mecanismo de NHEJ).

Figure 1. The four members of the PolX family contain a Pol β core, and only Pol β lacks a BRCT domain involved in protein:protein interactions. The fidelity of each enzyme is proportional to their degree of template dependence, contrary to their regulation. All 4 Pols like to make short DNA synthesis reactions, but they have preferred substrates: Pol β likes gaps, TdT likes to operate at a DNA end, and Pol λ and Pol μ synthesize across two DNA ends (a crucial ability to operate in NHEJ).

Research summary

Since the last 15 years, our group studies Pol λ and Pol μ (see Fig. 1), two eukaryotic enzymes involved in DSB repair by non-homologous end-joining (NHEJ). In collaboration with Dale Ramsden (Univ. Chapel Hill, NC USA), we carried out the *in vivo* analysis of Pol λ and Pol μ function by using cellular and mouse models of deficiency, confirming previous *in vitro* analysis that unravelled their preferred substrates, thus demonstrating their complementary and non-redundant role in NHEJ (Pryor et al. PNAS 2015). Pol λ and Pol μ must be regulated to gain selective access to the breaks during NHEJ. In collaboration with Jose Ruiz (Cabimer, Sevilla), we have recently shown that Pol λ is specifically phosphorylated by ATM upon induction of DSBs, improving its interaction with the DNA-PK/Ku complex, core components of NHEJ.

More recently, and in collaboration with Ian Holt (MRC, UK), and Juan Méndez (CNIO, Spain), our group discovered and characterized human PrimPol, involved in DNA damage tolerance during mitochondrial DNA replication, and repriming of stalled replication forks. Obtention of PrimPol-constitutive knock-out mice allowed us to study the relevance of this second primase *in vivo*, both at the nucleus and mitochondria. Mice lacking PrimPol showed a defective mitochondrial respiration, obesity at old age, hair loss, defects in mtDNA maintenance, and abnormal mtDNA copy numbers.

Finally, the characterization of TthPrimPol, carried out in collaboration with Sygnis AG, allowed the development of a new DNA amplification method (TruePrime™), based on the DNA primase activity of PrimPol (Picher et al. Nat. Comm. 2016), which is already in the market (see Fig. 2). By directed evolution of human PrimPol, we are exploring its potential to use both ribo and deoxynucleotides, and to copy both DNA and RNA templates. This method will be applied in collaboration with Sygnis to improve TthPrimPol.

Publicaciones / Publications

Martínez-Jiménez, M.I., García-Gómez, S., Bebenek, K., Sastre-Moreno, G., Calvo, P.A., Díaz-Talavera, A., Kunkel, T.A., Blanco, L. (2015) Alternative solutions and new scenarios for translesion synthesis by human PrimPol. *DNA Repair* (Amst), **29**:127-138.

Pryor, J.M., Waters, C.A., Aza, A., Asagoshi, K., Strom, C., Mieczkowski, P., Blanco, L., Ramsden, D.A. (2015) Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 4537-4545.

Baleriola, J., Álvarez-Lindo, N., de la Villa, P., Bernad, A., Blanco, L., Suárez, T., de la Rosa, E.J. (2016) Increased neuronal death and disturbed axonal growth in the Pol μ -deficient mouse embryonic retina. *Sci Rep.* **6**:25928.

Fernández-Orgil, A., Martínez-Jiménez, M.I., Alonso, A., Alcolea, P.J., Requena, J.M., Thomas, M.C., Blanco, L., Larraga, V. (2016) A putative Leishmania DNA polymerase theta protects the parasite against oxidative damage. *Nucleic Acids Res.* **44**(10):4855-4870.

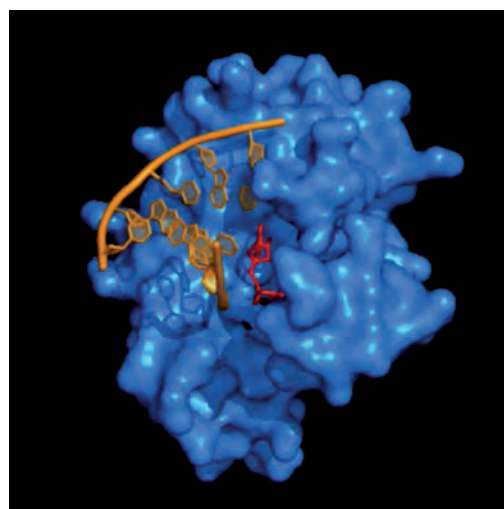
Picher, A.J., Wafzig, O., Krüger, C., García-Gómez, S., Martínez-Jiménez, M.I., Díaz-Talavera, A., Blanco, L., and Schneider A.* (2016) (* corresponding authors). TruePrime, a novel method for whole genome amplification from single cells based on TthPrimPol. *Nature Commun.* **7**:13296.

Figura 2. Modelo estructural de la TthPrimPol. El enzima TthPrimPol (en azul) se muestra en complejo con una cadena de DNA molde (naranja), sobre la que lleva a cabo la síntesis de iniciadores o primers, mediante la adición consecutiva de unidades de dNTPs (en rojo). Combinando la habilidad de TthPrimPol de fabricar primers de DNA con la excelente capacidad de elongación de la DNA polimerasa de $\phi 29$ es posible la amplificación exponencial e isotérmica del DNA de interés. Este método de amplificación, denominado TruePrime y desarrollado por Sygnis, puede verse en el siguiente enlace: <https://vimeo.com/181931857>.

Figure 2. Structural model for TthPrimPol. The enzyme TthPrimPol (in blue) is shown in complex with a DNA template strand (in orange), which directs the synthesis of short oligonucleotides (primers) by consecutive addition of dNTP units (in red). Combining the ability of TthPrimPol to make DNA primers with the excellent elongating capacity of $\phi 29$ DNA polymerase, any DNA can be exponentially and isothermally amplified. This method, called TruePrime and developed by Sygnis AG, is described in this link: <https://vimeo.com/181931857>.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Guillermo Sastre Moreno (2016). Polymerases specialized in damage tolerance and DNA double-strand break repair. Universidad Autónoma de Madrid. 2 de Noviembre de 2016. Director: Luis Blanco Dávila.



Bases moleculares de la citopatología viral y fúngica

Molecular bases of viral and fungal citopathology

Jefe de Línea/*Group Leader:*
Luis Carrasco Llamas

Personal Científico / *Scientific Staff:*
Miguel Ángel Sanz Fernández

Contratado Postdoctoral /
Postdoctoral Fellow:
Manuel García Moreno
Natalia Redondo Sevillano

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Ruth Alonso Valledor
Pablo Moral López
Esther González Almela

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
Carmen Hermoso Crispín
Diana Pisa García

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Hugh Williams
Ana María Fernández Fernández
Joaquín Santana Casillas

Resumen de investigación

Se han analizado los mecanismos que regulan la traducción de mRNAs virales, tales como los mRNAs del virus Sindbis y de otros virus con material genético RNA. 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 enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica.

Regulación de la traducción de mRNAs virales. 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 canónica, como es el eIF4A, que es inhibido de manera selectiva por la pateamina A. Además, la síntesis de proteínas tardías de este virus tiene lugar después de bloquearse la traducción de mRNAs celulares. Nuestros resultados recientes indican que esta inhibición se debe a la relocalización de proteínas del núcleo al citoplasma celular. También hemos determinado que la traducción del mRNA subgenómico se lleva a cabo por un mecanismo de "scanning" de la secuencia líder presente en su extremo 5' (Figura 1). Por otro lado, hemos publicado la presencia de un motivo de tres horquillas localizado en el extremo 3' de este mRNA, que le confiere traducibilidad de manera específica en células de insecto.

Enfermedades neurodegenerativas. Se han desarrollado varios ensayos para detectar la presencia de infecciones fúngicas, tanto en líquido cefalorraquídeo como en muestras de cerebro de pacientes diagnosticados con enfermedades neurodegenerativas. Se han detectado niveles elevados de macromoléculas fúngicas, tales como polisacáridos, proteínas y DNA en estas muestras. Además, se observa de manera directa la presencia de estructuras fúngicas (levaduras e hifas) en diversas regiones del cerebro de pacientes fallecidos de la enfermedad de Alzheimer ó de la esclerosis lateral amiotrófica (Figura 2). Estos resultados abren una nueva vía de investigación sobre la etiología de estas enfermedades.

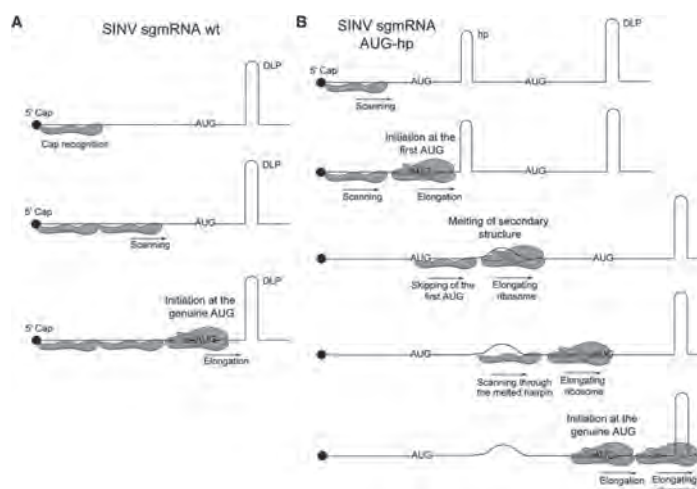


Figure 1. Modelo de la iniciación de la traducción del mRNA subgenómico del virus Sindbis. A) Traducción del mRNA viral sin modificar. B) Traducción del mRNA viral en el que se han introducido de manera artificial dos AUGs y una horquilla.

Figure 1. Model for the initiation of translation on SINV sgmRNAs. A) Translation of unmodified viral mRNA. B) Translation of Sindbis virus mRNA artificially bearing one hairpin and two AUG initiation codons.

Research summary

The mechanisms that regulate translation of viral mRNAs have been analysed. In addition, we have devoted some efforts to elucidate the presence of fungal infections as the potential etiology of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis.

Translational regulation of viral mRNAs. Sindbis virus constitutes a good model system for these studies. Translation of the subgenomic mRNA from Sindbis virus does not require several initiation factors, such as eIF4A, that is selectively blocked by pateamine A. This factor is not required in the infected cells, but it is necessary in cell free systems. Moreover, the synthesis of late viral proteins takes place after a profound inhibition of cellular translation. Our recent findings indicate that this blockade is due to the relocalization of cellular proteins from the nucleus to the cytoplasm. Also, we have demonstrated that the mechanism of viral mRNA translation occurs by a scanning mechanism of the 5' leader sequence (Figure 1). On the other hand, we have reported the presence of an RNA motif consisting of three hairpins located at the 3'-UTR of the viral mRNA. By the first time, we have demonstrated that this motif confers translatability in a cell-specific manner.

Neurodegenerative diseases. A number of assays have been developed to detect the presence of fungal infections in cerebrospinal fluid and brain samples from patients diagnosed with neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Elevated levels of fungal macromolecules have been detected, such as polysaccharides, proteins and DNA. In addition, we have observed directly the existence of fungal structures (yeast and hyphae) in brain tissue from patients diagnosed of Alzheimer's disease or amyotrophic lateral sclerosis (Figure 2). These findings open a new field of research on the etiology of these neurodegenerative diseases.

Publicaciones / Publications

García-Moreno, M., Sanz, M.A. and Carrasco, L. 2015. Initiation codon selection is accomplished by a scanning mechanism without crucial initiation factors in Sindbis virus subgenomic mRNA. *RNA* **21**, 93-112.

Pisa, D., Alonso, R., Juarranz, A., Rábano, A. and Carrasco, L. 2015. Direct visualization of fungal infection in brains from patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **43**, 613-624.

Alonso, R., Pisa, D., Marina, A.I., Morato, E., Rábano, A., Rodal, I. and Carrasco, L. 2015. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *International J. Biol. Sci.* **11**, 546-558.

González-Almela, E., Sanz, M.A., García-Moreno, M., Northcote, P., Pelletier, J. and Carrasco, L. 2015. Differential action of pateamine A on translation of genomic and subgenomic mRNAs from Sindbis virus. *Virology* **484**, 41-50.

Sanz, M.A., García-Moreno, M. and Carrasco, L. 2015. Inhibition of host protein synthesis by Sindbis virus: correlation with viral RNA replication and release of nuclear proteins to the cytoplasm. *Cell Microbiol.* **17**, 520-541.

Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E. and Carrasco, L. 2015. Impact of vesicular stomatitis virus M proteins on different cellular functions. *PLoS One* **10**(6), e0131137.

Alonso, R., Pisa, D., Rábano, A., Rodal, I. and Carrasco, L. 2015. Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients contains fungal proteins and DNA. *J. Alzheimers Dis.* **47**, 873-876.

Pisa, D., Alonso, R., Rábano, A., Rodal, I. and Carrasco, L. 2015. Different brain regions are infected with fungi in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **5**, 15015.

Nieva, J.L. and Carrasco, L. 2015. Viroporins: Structures and functions beyond cell membrane permeabilization. *Special Issue Viruses*, **7**, 5169-5171.

Monroy, N., Herrero, L., Carrasco, L. and González, M.E. 2016. Influence of glutathione availability on cell damage induced by human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *Virus Research*. **213**, 116-123.

García-Moreno, M., Sanz, M.A. and Carrasco, L. 2016. A viral mRNA motif at the 3'-untranslated region that confers translatability in a cell-specific manner. Implications for virus evolution. *Sci. Reports*. **12**, 19217.

Pisa, D., Alonso, R., Rábano, A., and Carrasco, L. 2016. Corpora amylacea of brain tissue from neurodegenerative diseases are stained with specific antifungal antibodies. *Frontiers Neurosci.* **86**.

Pisa, D., Alonso, R., Rábano, A., Horst, M., and Carrasco, L. 2016. Fungal enolase, β -tubulin and chitin are detected in brain tissue from Alzheimer's disease patients. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1772.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Manuel García Moreno (2015). Mecanismos de iniciación de la traducción de los mRNAs del virus Sindbis. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Luis Carrasco Llamas. Co-dirección: Miguel Angel Sanz.

Pablo Moral López (2016). Regulación de la traducción de mRNAs virales y celulares. Efecto de proteasas virales. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Luis Carrasco Llamas.

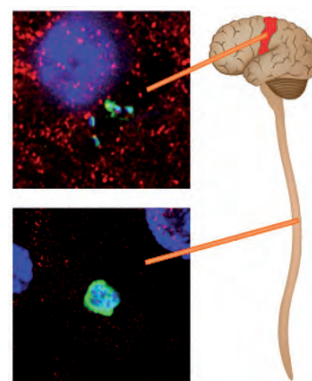


Figura 2. Análisis inmunohistoquímico de estructuras fúngicas en el sistema nervioso central de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Se muestra una sección de la corteza motora y otra de la médula espinal. Aparece el núcleo de las células nerviosas teñido con DAPI (azul), las estructuras fúngicas (verde) y neurofilamentos (rojo).

Figure 2. Immunohistochemistry analysis of fungal structures in the central nervous system of a patient diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Sections of the motor cortex and the spinal cord are shown. DAPI staining (blue), fungal structures (green) and neurofilaments (red).

Control traduccional de la respuesta al estrés en eucariotas

Translation control of stress response in eukaryotes

Jefe de Línea / *Group Leader:*
César de Haro Castilla

Personal Científico /
Scientific Staff:
Juan José Berlanga Chiquero
Miguel Ángel Rodríguez Gabriel

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Tamara Jiménez Saucedo

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
José Alcalde García
Alejandro Arandilla Alcón

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Leire Aramendía Yerro
María García González
Teresa García Prieto
Celia Pérez Pérez
Joan Sala Gastón

Resumen de investigación

Continuamos estudiando los mecanismos moleculares implicados en la respuesta adaptativa de las células al estrés ambiental, incluyendo estrés oxidativo, privación de nutrientes y radiación UV. Para entender cómo las células reprograman la traducción de mRNAs para enfrentarse al estrés, estamos interesados en las implicaciones biológicas de esta adaptación en transformación celular, supervivencia y envejecimiento. Nos centramos en cómo la fosforilación de eIF2 por las cuatro quinasas que responden al estrés (GCN2, PKR, HRI y PERK) afectan a la traducción global y específica de mRNAs.

Estamos analizando los efectos biológicos de la fosforilación de eIF2 y la respuesta al estrés en supervivencia celular, patología y envejecimiento. La utilización de animales carentes de GCN2 permitirán probar si la activación de esta quinasa está implicada en beneficios fisiológicos tales como la extensión de la vida inducida por una dieta baja en metionina o la protección frente a lesiones tumorales de piel inducidas por UV.

Para el futuro, planeamos: i) comprobar los vínculos entre respuesta al estrés, fosforilación de eIF2, atenuación de la traducción, longevidad y respuesta frente al cáncer, en animales; ii) confirmar el papel de la fosforilación de eIF2 y la atenuación de la traducción en el proceso de envejecimiento cronológico en levaduras de fisión; iii) analizar cambios en la traducción de mRNAs en respuesta a la fosforilación de eIF2 durante el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento en la levadura de fisión por medio del estudio de perfiles de ribosomas y secuenciación de RNA. Este análisis podría revelar una alteración funcional programada en la maquinaria de traducción (ribosomas y factores de iniciación) orientada a cambiar el proteoma celular para dar una respuesta adecuada al estrés. Estamos incorporando nuevas herramientas, como “ribosome profiling” y biología de sistemas para impulsar nuestra investigación a un mayor nivel de detalle molecular y de competitividad.

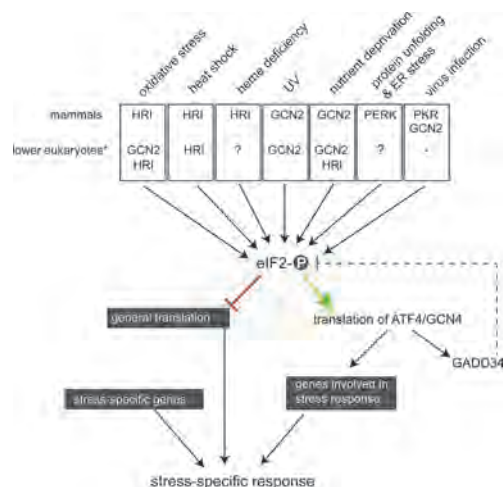


Figura 1. eIF2 α quinasas y respuesta integrada al estrés (ISR). Las células eucariotas detectan el estrés ambiental activando de forma diferencial las distintas eIF2 α quinasas. Estas señales confluyen en la fosforilación de eIF2 α promoviendo la atenuación general de la síntesis de proteínas, pero estimulando la traducción de mRNAs específicos (p.ej. ATF4). ATF4 activa la transcripción de un conjunto de genes implicados en la respuesta y adaptación al estrés (p.ej. GADD34). Esta reprogramación traduccional, junto a la transcripción específica de estrés, genera una respuesta adaptada a las diferentes formas de estrés.

Figure 1. eIF2 α kinases and the integrated stress response (ISR). Cells sense environmental stresses and differentially activate eIF2 α kinases, both in lower and higher eukaryotes. These signals funnel into eIF2 α phosphorylation leading to attenuation of general translation, and activating translation of specific mRNAs (e.g. ATF4). ATF4 activates transcription of a basic set of genes involved in stress response and recovery (e.g. GADD34). This translational reprogramming, along with stress-specific transcription, generates a tailored response to different stresses.

Research summary

In this period, we have continued studying some of the molecular mechanisms involved in the adaptive response of cells to different types of stress, including oxidative stress, nutrient deprivation and UV radiation. Aimed to understand how cells reprogram translation of mRNAs to cope with stress, we are also interested in the biological implications that this adaptation could have in cellular transformation, survival and ageing. We are mainly focused on the implications of eIF2 phosphorylation by the four different stress responding kinases (GCN2, PKR, HRI and PERK) that affect global and specific mRNA translation during stress.

In the last two years, we have undertaken the analysis of biological effects of eIF2 phosphorylation and stress response in organism survival, pathology and ageing. Some of these experiments involve the use of GCN2 knock out animals to test whether activation of this kinase is involved in some physiological benefits such as life extension induced by low methionine diet or protection from UV-induced skin tumour lesions.

For the future, we plan to: i) complete the experiments in animals aimed to test the links between stress response, eIF2 phosphorylation, translation attenuation, longevity and anti-cancer responses; ii) complete the experiments of chronological ageing in fission yeast which confirm the role of eIF2 phosphorylation and translation attenuation in this process; iii) analyse changes in mRNA translation in response to eIF2 phosphorylation induced during the establishment of stationary phase of growth in fission yeast by means of ribosome profiling and RNAseq. This analysis could reveal a programmed functional alteration in translation machinery (40S subunits and initiation factors) that could change cell proteome for proper response to stress. We are in the process to incorporate new tools in our lab such as ribosome profiling and systems biology to boost our research into a higher level of molecular detail and competitiveness.

Publicaciones / Publications

Berlanga, J.J., de Haro, C., Rodríguez-Gabriel, M.A. and Ventoso, I. (2016) eIF2 α kinases and the evolution of stress response in eukaryotes. In: Hernández, G. and Jagus, R. (eds) Evolution of the Protein Synthesis Machinery and its Regulation. *Springer*, pp261-276.

Berlanga, J.J. (2016) Respuesta al estrés celular. Implicaciones en envejecimiento y otras patologías relacionadas con la edad. En: EXPERIENCIAS INVESTIGADORAS EN EL UNIVERSO MULTIDISCIPLINAR N° 53 Mayo-Agosto 2016 Encuentros Multidisciplinares Jesús Lizcano (Ed.).

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
José Miguel Fernández Justel

Estudiantes / Undergraduate Students:
Alba Álvarez Franco
Cristina Santa María Tobías
Adrián Fernández Sánchez
Natalia Martín Moreira
Alberto Ferrera Lagoa

Resumen de investigación

El interés de nuestro grupo de investigación se centra en entender la organización funcional del genoma eucariótico y, en particular, la interrelación entre la replicación del DNA, la transcripción y la estructura de la cromatina.

En estos últimos años hemos estudiado el modo en el que el empaquetamiento del DNA en nucleosomas, y la conformación de cromatina resultante, influyen en la activación de los sitios de iniciación de la síntesis del DNA y en la dinámica de la replicación utilizando dos sistemas experimentales complementarios: (1) sistemas genéticos de mamíferos con distintas alteraciones en la proporción DNA-nucleosomas y (2), la particular organización genómica del parásito humano *Leishmania major*. En conjunto hemos encontrado que la conformación de la cromatina regula la dinámica tanto de la transcripción como de la replicación, y que el programa temporal y espacial de la replicación del DNA están asociados a la cinética de la RNA polimerasa II. Estos resultados ilustran la íntima relación existente entre los procesos básicos del genoma y la estructura de la cromatina en la que ocurren lo que, muy probablemente, provee de robustez y flexibilidad a los genomas eucarióticos, a la vez que mantiene su estabilidad genética.

Basándonos en estos trabajos actualmente estamos investigando los mecanismos detallados por los que las células en división responden de manera integrada a deficiencias en la estructura de la cromatina. Para ello utilizamos una combinación de aproximaciones genómicas, bioinformáticas, técnicas de alta resolución de biología molecular y análisis de moléculas individuales. Este conocimiento integral es necesario para futuras intervenciones terapéuticas en situaciones de pérdida de nucleosomas, como ocurre de manera fisiológica durante el envejecimiento celular, o en situaciones patológicas como algunas enfermedades humanas del desarrollo.

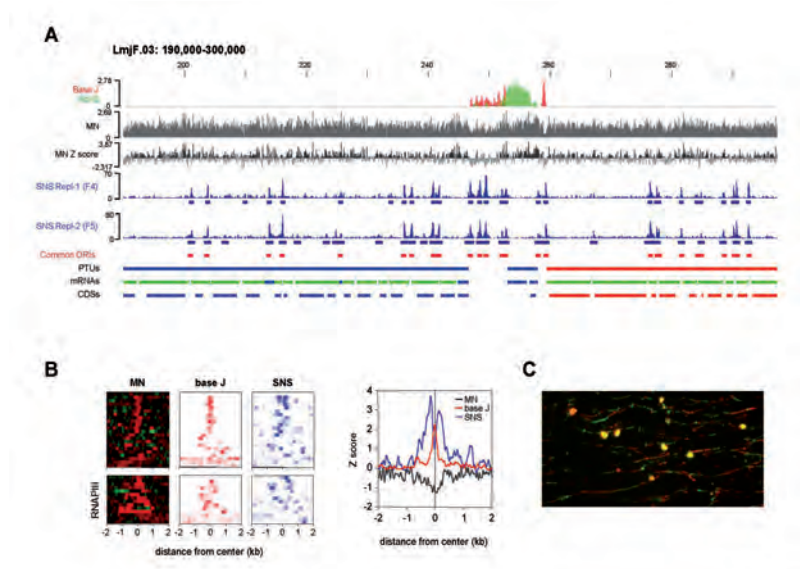


Figura 1. (A) Mapa genómico de la ocupación nucleosomal y localización de cadenas de replicación nacientes en relación con las unidades policistónicas y los genes en *Leishmania major*. (B) Mapas de color ilustrando la posición relativa de los sitios de terminación de la transcripción, cadenas de replicación nacientes y nucleosomas. (C) Imagen de moléculas individuales de DNA marcadas con los análogos de nucleótidos CldU (rojo) y IdU (verde). Los círculos amarillos corresponden a maxiplásmidos que se han replicado completamente durante el tiempo de marcaje.

Figure 1. (A) Genomic map of mononucleosome occupancies and short nascent strands localization in relationship with polycistronic units and genes in *Leishmania major*. (B) Heatmaps illustrating the relative position of transcription termination sites, short nascent strands and nucleosomes. (C) Image of single DNA molecules labelled with nucleotide analogs CldU (red) and IdU (green). The yellow circles correspond to maxiplasmids that have replicated completely within the labelling time.

Research summary

The main research interest of our group is understanding the functional organization of the eukaryotic genome and, in particular, the crosstalk between DNA replication, transcription and chromatin conformation.

*During the last years, we studied how nucleosomes and chromatin structure influence the activation of DNA replication initiation sites and replication dynamics using two complementary experimental systems: (1), mammalian genetic systems with altered DNA-nucleosome ratios, and (2), the particular genomic arrangement of the early branched eukaryote *Leishmania major*. Collectively, we found that chromatin configurations strongly impact on the dynamics of both replication and transcription, and that the spatial and the temporal programme of DNA replication are linked to RNA polymerase kinetics. These results illustrate the intimate relationship between DNA replication, transcription and chromatin structure that likely provides robustness and flexibility to eukaryotic systems while help maintaining genome stability. Building-up from our recent work, we are currently investigating the mechanisms by which cycling cells respond in an integrated way to chromatin structure defects. To tackle this we employed a combination of genome-wide approaches, bioinformatics, high-resolution molecular biology and single molecule techniques. This integrative understanding is instrumental for future therapeutical interventions in situations of nucleosome loss such as cellular aging and human developmental diseases.*

Publicaciones / Publications

Lombráña, R., Almeida, R., Álvarez, A., Gómez, M. (2015) R-loops and initiation of DNA replication in human cells: a missing link? *Front. Genet.* **6**, 158

Lombráña R, Álvarez A, Fernández-Justel JM, Almeida R, Poza-Carrón C, Gomes F, Calzada A, Requena JM, Gómez M. (2016) Transcriptionally driven DNA replication program of the human parasite *Leishmania major*. *Cell. Rep.* **16**, 1774-1786.

División celular, replicación del genoma y cromatina

Cell division, genome replication and chromatin



Jefe de Línea / *Group Leader:*
Crisanto Gutiérrez

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Bénédicte Desvoyes
Joana Sequeira-Mendes
(Hasta agosto 2016)
María Fernández Marcos

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Zaida Vergara Pardillo
Carla Mendez Losi
Ana Sofía Madeira
Clara Echevarria Zomeño
Sofía Otero Pérez
(Hasta mayo 2015)

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Victoria Mora-Gil Cobo

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Aitor Sánchez Hernández
María Delgado Barea
(Hasta septiembre 2015)
David Schlager
(Hasta junio 2015)
Ainhoa Arana Echarri
(Hasta julio 2016)
Isabel Pérez Garrido
(Hasta enero 2016)

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 (Figura 1) 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 duplicarse en cada ciclo celular (Figura 2). 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 del DNA 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.

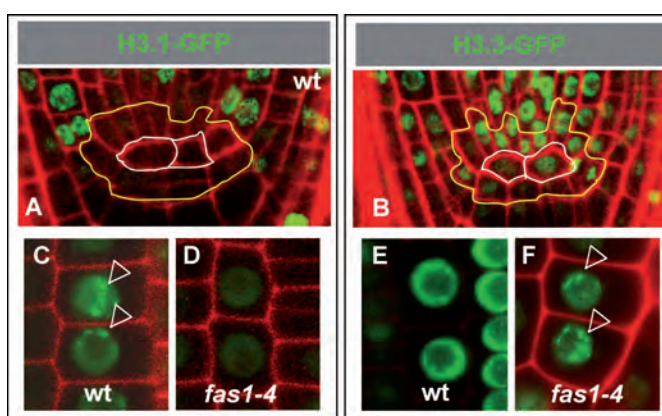


Figura 1. Dinámica de la histona H3. La histona canónica H3.1 (A), pero no la variante H3.3 (B), se elimina casi totalmente de las células del centro quiescente (línea blanca, A-B) y de las del nicho de células madre (línea amarilla, A-B). La histona H3.1 está enriquecida en la heterocromatina (C; flechas). Mutaciones en la chaperona de histonas CAF-1 (*fas1-4*) reducen la incorporación de H3.1 (D) y producen el enriquecimiento ectópico de la variante H3.3 en la heterocromatina (E,F; flechas).

Figure 1. Histone H3 dynamics. The canonical H3.1 (A) but not the H3.3 variant is almost completely evicted in the quiescent center (white line, A-B) cells and the stem cell niche (yellow line, A-B). Histone H3.1 is enriched in heterochromatin (C; arrowheads). Mutations in the H3.1 chaperone CAF-1 (*fas1-4*) reduce overall H3.1 incorporation (D) and lead to ectopic enrichment of the H3.3 variant in heterochromatin (E,F; arrowheads).

Research summary

The transition to multicellularity required the evolution of novel structures and mechanisms to coordinate cell division, acquisition of cell fates and cell differentiation, and the 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 offers 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 (Figure 1): 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 (Figure 2). 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 DNA 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

Gutierrez, C., Puchta H. (2015) Chromatin and Development: a Special issue. *Editorial. Plant J.* **83**, 1-3.

Sequeira-Mendes, J., Gutierrez, C. (2015) Links between genome replication control and chromatin landscapes. *Plant J.* **83**, 38-51.

Sequeira-Mendes, J., Gutierrez, C. (2016) Genome architecture: from linear organisation of chromatin to 3D assembly in the nucleus. *Chromosoma* **125**, 455-469.

Rodríguez-Mega, E., Pyñeiro-Nelson, A., Gutierrez, C., García-Ponce, B., Sanchez, M.P., Zluhen-Martinez, E., Alvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A. (2015) The role of transcriptional regulation in the evolution of plant phenotype. *Dev. Dyn.* **244**, 1074-1095.

Mauri, N., Fernandez-Marcos, M., Costas, C., Desvoves, B., Pichel, A., Caro, E., Gutierrez, C. (2016) GEM, a member of the GRAM domain family of proteins, is part of the ABA signaling pathway. *Sci. Rep.* **6**, 22660.

Otero, S*, Desvoves, B*, Peiró, R., Gutierrez, C. (2016) Histone H3 dynamics uncovers domains with distinct proliferation potential in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **28**, 1361-1371.

Gutierrez, C. (2016) 25 years of cell cycle research: what's ahead? *Trends Plant Sci.* **21**, 823-833.

Havlová, K., Dvořáčková, M., Peiro, R., Abia, D., Mozgová, I., Vansáčová, L., Gutierrez, C., Fajkus, J. (2016) Variation of 45S rDNA intergenic spacers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* **92**, 457-471.

Desvoves, B., Gutierrez, C. (2016) A plant solution to the CDK conundrum in the DNA damage response. *EMBO J.* **35**, 2061-2063.

García-Cruz, K., García-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M.P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoves, B., Pacheco-Escobedo, M., Tapia-López, R., Ransom-Rodríguez, I., Gutierrez, C., Alvarez-Buylla, E. (2016) The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the *Arabidopsis* root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell cycle components. *Ann. Bot.* **118**, 787-796.

Gutierrez, C., Desvoves, B., Vergara, Z., Otero, S., Sequeira-Mendes, J. (2016) Links of genome replication, transcriptional silencing and chromatin dynamics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **34**, 92-99.

Otras actividades / Other activities

Editorial Board EMBO J., EMBO Rep.

Editor Plant J.

Tesis doctorales / Doctoral theses

Sofia Otero Perez (2015) Histone H3 function and dynamics during *Arabidopsis* development. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Crisanto Gutiérrez. Mención Europea.

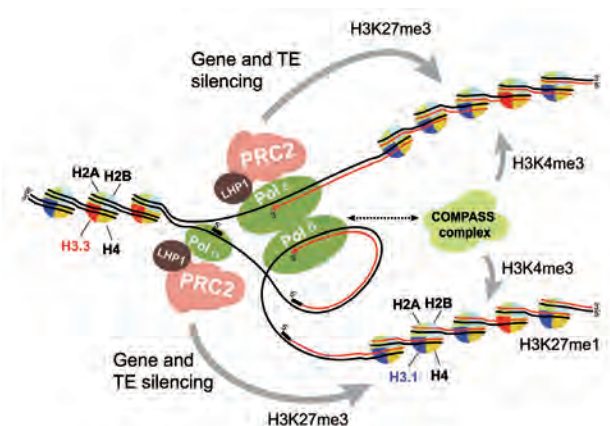


Figura 2. Cromatina y silenciamiento génico durante la replicación del DNA. Los nucleosomas se desensamblan antes de la horquilla de replicación y los nuevos contienen exclusivamente la histona H3.1 (azul). El DNA de nueva síntesis (rojo) posee primers de RNA (negro). Las 3 DNA polimerasas (Pol δ , Pol ϵ , Pol α) elongan la cadena retrasada, la líder y sintetizan los primers de RNA, respectivamente. Varios complejos (PRC2, LHP1, COMPASS) modifican la cromatina recién formada. Las chaperonas de histonas y otras proteínas accesorias no se han incluido para simplificar el esquema (adaptada de Gutierrez et al. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2016)).

Figure 2. Chromatin and gene silencing during DNA replication. Nucleosomes are disassembled in front of the DNA replication fork and the newly reassembled nucleosomes contain exclusively histone H3.1 (blue). Newly synthesized DNA strands (red) possess RNA primers (black). The three DNA polymerases (Pol δ , Pol ϵ , Pol α) elongate the lagging strand, the leading strand and synthesize the RNA primers, respectively. Histone chaperones and DNA replication accessory proteins have been omitted for simplicity. Various complexes (PRC2, LHP1, COMPASS) modify histone tails in newly formed chromatin (adapted from Gutierrez et al. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2016)).

Iniciación interna de la traducción en mRNAs eucarióticos

Internal initiation of translation in eukaryotic mRNAs

Jefe de Línea / *Group Leader:*
Encarnación Martínez-Salas

Técnico de Investigación /
Technical Assistance:
Jorge Ramajo

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Gloria Lozano
Rosario Francisco-Velilla
Rosa Diaz-Toledano

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
Javier Fernández-Chamorro
Azman Mohamed Embarek

Resumen de investigación

La regulación de la síntesis de proteínas es un paso clave en muchos procesos biológicos; su descontrol conduce a patologías graves. A su vez, la capacidad codificante del genoma es mucho mayor de lo anticipado. Nuestro grupo está interesado en entender mecanismos alternativos de iniciación de la traducción. Los sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) sustituyen la función del extremo 5' cap, que en mRNAs típicas proporciona el sitio de anclaje de la maquinaria de traducción. Los elementos IRES son regiones del mRNA que forman complejos ribonucleoproteicos en los que la estructura del RNA determina su actividad. Sin embargo, no se conoce un motivo universal predictivo de elementos IRES. En este periodo hemos profundizado en la investigación de la organización estructural de elementos IRES, así como en la caracterización de proteínas que intervienen en el inicio de la traducción. Objetivos específicos han sido la identificación de proteínas y RNAs asociados a factores que modulan la actividad IRES, la evaluación del sinergismo de factores implicados en control de traducción, y la definición de motivos estructurales del IRES esenciales para su función (Figura 1). Mediante un abordaje multidisciplinar de proteómica y genómica combinado con análisis funcionales y estructurales, hemos demostrado que la traducción dependiente de IRES está regulada negativamente por Gemin5, una proteína multifuncional que contiene un sitio de unión a RNA bipartito atípico en su región carboxilo terminal. A su vez, el extremo amino-terminal contiene 14 motivos WD; esta región de la proteína facilita la interacción directa con el ribosoma a través de la subunidad 60S (Figura 2). La consecución de estos objetivos ha arrojado luz sobre el mecanismo que gobierna la iniciación de la traducción dirigida por elementos IRES, lo que permitirá la predicción de motivos semejantes a IRES que permanecen escondidos en el transcriptoma de la célula.

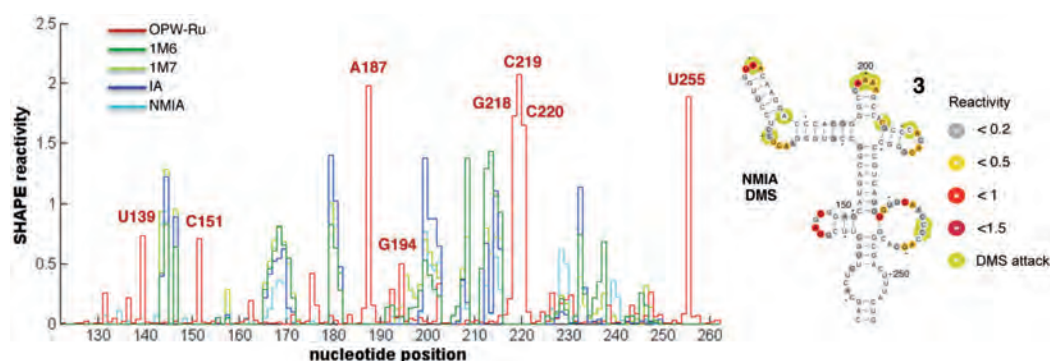


Figura 1. Análisis estructural del IRES mediante diferencial SHAPE.

Figure 1. IRES differential SHAPE RNA reactivity.

Research summary

Regulation of protein synthesis is a key step of many biological processes; its dysfunction leads to severe diseases. In addition, the coding capacity of the genome is much larger than ever anticipated. 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. IRES elements substitute the function of the 5' terminal cap present in conventional mRNAs, which is the anchoring point the translation machinery. To achieve their function, IRES elements assemble ribonucleoprotein complexes in which RNA structure and IRES function is tightly coupled. However, a universal IRES motif remains to be elucidated, hampering the prediction of these regulatory elements genome-wide. During this period, we have made important contributions to the functional and structural characterization of a model IRES element, and the characterization of proteins involved in internal initiation of translation. Our specific aims were the identification of protein and RNA partners of factors modulating IRES activity, the evaluation of synergism and/or interference with other factors involved in translation control, and the understanding of structural constraints in IRES elements which are essential for its activity (Figure 1). Using a multidisciplinary approach based on proteomic and genomic analysis, combined with functional and structural assays, we have shown that IRES-dependent translation is downregulated by Gemin5. This multifunctional protein harbors a bipartite non-conventional RNA-binding site on its C-terminal region. In turn, the N-terminal domain of this protein contains 14 WD repeats. This region mediates the interaction with the ribosome via the 60S subunit (Figure 2). Achievement of these goals has shed light on the molecular mechanism governing internal initiation driven by a model IRES element, allowing the prediction of hidden IRES-like motifs in the cellular transcriptome.

Publicaciones / Publications

Lozano, G., Trapote, A., Ramajo, J., Elduque, X., Grandas, A., Robles, J., Pedroso, E., and Martínez-Salas, E. (2015) RNA local flexibility perturbation of the IRES element induced by a novel ligand inhibits viral RNA translation. *RNA Biol.* **12**, 555-568.

Lozano, G., and Martínez-Salas, E. (2015) Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr. Opin. Virol.* **12**, 113-120.

Piñeiro, D., Fernandez-Chamorro, J., Francisco-Velilla, R., and Martínez-Salas, E. (2015) Gemin5: a multitasking RNA-binding protein involved in translation control. *Biomolecules* **5**, 528-544.

Martínez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., and Diaz-Toledano, R. (2015) Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res.* **206**, 62-73

Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., Diaz-toledano, R., and Martínez-Salas, E. (2015) RNA-protein interaction methods to study viral IRES elements. *Methods* **91**, 3-12.

Lozano, G., Jimenez-Aparicio, R., Herrero, S., and Martínez-Salas, E. (2016) Fingerprinting the junctions of RNA secondary structure by an open-paddle wheel diruthenium compound. *RNA* **22**, 330-338.

Lozano, G., Fernandez, N., and Martínez-Salas, E. (2016) Modeling three-dimensional structural motifs of viral IRES. *J. Mol. Biol.* 2016, **428**, 767-776.

Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Ramajo, J., and Martínez-Salas, E. (2016) The RNA-binding protein Gemin5 binds directly to the ribosome and regulates global translation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8335-8351.

Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., Garcia-Martin, J.A., Ramajo, J., Dotu, I., Clote, P., and Martínez-Salas, E. (2016) Designing synthetic RNAs to determine the relevance of structural motifs in picornavirus IRES elements. *Sci. Rep.* **6**, 24243.

Garcia-Martin, J.A., Dotu, I., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., Ramajo, J., Martínez-Salas, E., and Clote, P. (2016) RNAiFold2T: constraint programming design of thermo-IRES switches. *Bioinformatics* **32**, i360-i368.

Francisco-Velilla, R., Lozano, G., Diaz-Toledano, R., Fernandez-Chamorro, J., Embarek, M. A., and Martínez-Salas, E. (2016) IRES elements: issues, controversies and evolutionary perspectives. In: R. Jagus, G. Hernandez (Eds) *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation*. Springer, Springer International Publishing AG Switzerland. pp. 547-564.

Otras actividades / Other activities

E Martínez-Salas es miembro del Comité Editorial de Virology, Virus Res, Front in Microbiol, Peer J.

E Martínez-Salas is member of the Editorial Board of Virology, Virus Res, Front in Microbiol, Peer J.

Patentes / Patents

Lozano, G., Reyes Jimenez-Aparicio, Herrero, S y E. Martínez-Salas. Compuestos de dirutenio con estructura de rueda de paletas abierta (*open-paddlewheel*) y su interacción con ácidos nucleicos. UCM - CSIC N° 201500550, España (2015). Internacional PCT/ES2016/000081 (21/07/2016).

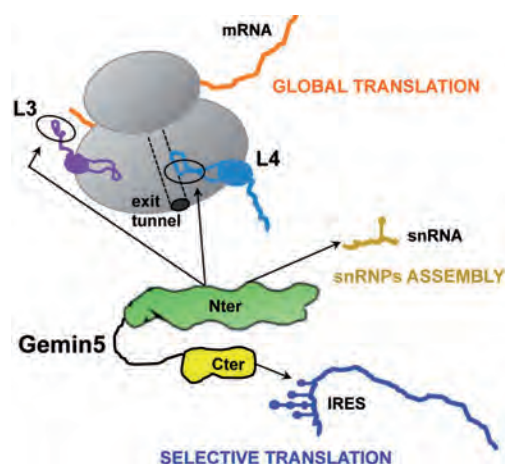


Figura 2. Funciones de Gemin5 en control de traducción y ensamblaje de snRNPs.

Figure 2. Gemin5 role in translation control and assembly of snRNPs.

Regulación de la expresión génica en *Leishmania*Regulation of gene expression in *Leishmania*

Jefe de Línea / *Group Leader:*
José María Requena Rolanía

Personal Científico /
Scientific Staff:
Manuel Solo Álvarez

Contratado Postdoctoral /
Postdoctoral Fellow:
Esther Garde Contreras
Salvador Iborra Martín
César Poza Carrión
Laura Ramírez García

Becarios Predoctorales /
Graduate Students:
José Carlos Solana Morcillo
Laura Corvo Villén
Esther Camacho Cano

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Cristina Díaz Ruiz
Francisco Javier Escudero Ruiz
Cristina Esteso Moya
Araceli García Mora
Sandra González de la Fuente
Antonio Landete Ortega
Jose Peinado Serrano

Científicos Visitantes /
Visiting Scientist:
Paola Andrea Nocua Martínez
(Pontificia Universidad Javeriana,
Bogotá, Colombia)

Resumen de investigación

La actividad del grupo está dirigida al estudio de aspectos moleculares del protista *Leishmania*, y de la inmunopatología que produce al infectar al huésped. Por un lado, hemos continuado estudiando procesos moleculares responsables de la peculiar manera en que este organismo regula la expresión génica, que ocurre en ausencia de regulación transcripcional. Por otro lado, hemos trabajado en el desarrollo de estrategias para el control de la leishmaniasis, una enfermedad que afecta a millones de personas.

Mediante técnicas de secuenciación masiva, estamos estableciendo los transcriptomas de varias especies de *Leishmania* (y mejorando las anotaciones genómicas) con la meta de identificar elementos reguladores, frecuentemente localizados en las regiones 3' no traducidas de los mRNAs, y de proteínas de unión a RNA, claves en la regulación de la expresión génica. Este proyecto está siendo realizado en estrecha colaboración con la Dra Begoña Aguado (CBMSO). Otra contribución destacable ha sido la localización a escala genómica de orígenes de replicación en *L. major*, un proyecto que ha sido dirigido por la Dra María Gómez (CBMSO).

En la parcela sobre aspectos inmunopatológicos de la infección por *Leishmania*, dirigida por el Dr Manuel Soto, hemos avanzado en la caracterización de factores del parásito que interfieren con la respuesta inmunitaria del huésped. Asimismo, se han evaluado nuevas estrategias para el tratamiento y diagnóstico, y ensayado candidatos vacunales, en base al análisis de muestras procedentes de pacientes humanos y caninos, y al uso de infección experimental en modelos animales. Además, venimos participando en un Proyecto financiado por la comisión europea (FP7), titulado "Clinical Studies on a Multivalent Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis" y que tiene como objetivo el desarrollo de una vacuna frente a la leishmaniasis visceral humana.

Asimismo, nuestro grupo ha participado en un proyecto coordinado, titulado "PrimPol, una nueva DNA primasa/polimerasa con un papel en el envejecimiento" y financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid. Finalmente, como integrantes de la red de enfermedades Tropicales del ISCIII, hemos participado en diversas actividades colaborativas con grupos clínicos.

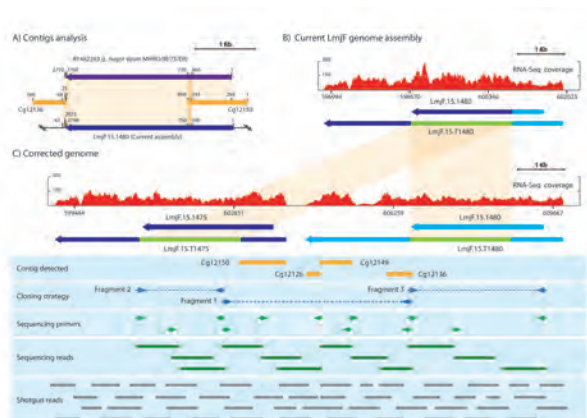


Figura 1. Reconstrucción de una región genómica de *L. major* y definición de transcritos mediante técnicas de secuenciación masiva (Alonso et al. 2016).

Figure 1. Reconstruction of an *L. major* genomic region and transcript definition by massive sequencing techniques (Alonso et al. 2016).

Research summary

The research activity of our group has been focused on molecular aspects of the protist *Leishmania* and the immune-pathology that the infection of this parasite causes. On the one hand, we have continued studying molecular processes associated with the peculiar mechanisms of gene expression in an organism in which transcriptional regulation is almost absent. On the other hand, we have conducted activities aimed to develop strategies to control leishmaniasis, a disease that continues affecting millions of people worldwide.

By using massive sequencing techniques, we are studying the transcriptomes of several *Leishmania* species (and improving the genomic annotations) with the goal of identifying 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. These tasks are being done in close collaboration with Dr. Begoña Aguado (also at CBMSO). Another relevant contribution made in this period has been a genome-wide scale mapping of replication origins in *L. major*, a collaborative work directed by Dr. María Gomez (also at CBMSO).

Within the research line on immuno-pathological aspects, headed by Dr. Manuel Soto, we have been focused on the interactions between *Leishmania* and the mammalian immune system, characterizing parasite factors able to interfere with the induction of protective immune responses. Additionally, new strategies for the development of specific treatments, diagnostic systems as well as vaccines have been explored from the analysis of samples derived from human and canine patients, together with animal models of experimental leishmaniasis.

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; EU contract 603181)* is aimed to develop a vaccine against human visceral leishmaniasis (<http://www.mulevacclin.eu>). In addition, our group has also participated in a Madrid Community project entitled "*PrimPol: a new DNA primase/polymerase with a role in ageing*" (<http://vmbacterio.cbm.uam.es/primpol/Primpol/Inicio.html>). Finally, as members of the Tropical Diseases network (ISCIII; <http://www.ricet.es/es/>), our group have been engaged in collaborative activities with clinical teams.

Publicaciones / Publications

Soto, M., Corvo, L., Garde, E., Ramírez, L., Iniesta, V., Bonay, P., Gómez-Nieto, C., González, V.M., Martín M.E. Alonso, C., Barral, A., Barral-Netto, M. and Iborra, S. (2015). *PLoS Negl Trop Dis*. **9**, e0003751.

Lage, D.P., Martins, V.T., Duarte, M.C., Garde, E., Chávez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Tavares, C.A., Soto, M. and Coelho, E.A. (2015). *Parasite Immunol*. **37**, 646-656.

Duarte, M.C., Pimenta, D.C., Menezes-Souza, D., Magalhães, R.D., Diniz, J.L., Costa, L.E., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, P.S., Bartholomeu, D.C., Alves, M.J., Fernandes, A.P., Soto, M., Tavares, C.A., Gonçalves, D.U., Rocha, M.O. and Coelho, E.A. (2015). *Clin Vaccine Immunol*. **22**, 1187-1196.

Guerra-Pérez, N., Ramos, E., García-Hernández, M., Pinto, C., Soto, M., Martín, M.E. and González VM. (2015) Molecular and functional characterization of ssDNA aptamers that specifically bind *Leishmania infantum* PABP. *PLoS One*. **10**, e0140048.

Lage, P.S., Chávez-Fumagalli, M.A., Mesquita, J.T., Mata, L.M., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Soto, M., Tavares C.A., Leite, J.P., Tempone, A.G., and Coelho, E.A. (2015). *Parasitol Res*. **114**, 4625-4635.

Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, D.P., Duarte, M.C., Garde, E., Costa, L.E., Silva, V.G., Oliveira, J.S., Magalhães-Soares, D.F., Teixeira, S.M., Fernandes, A.P., Soto, M., Tavares, C.A., and Coelho, E.A., (2015). *PLoS One*. **10**, e0137683.

Coelho, E.A., Chávez-Fumagalli, M.A., Costa, L.E., Tavares, C.A., Soto, M. and Goulart, L.R. (2015). *Rev Soc Bras Med Trop*. **48**, 370-379.

Costa, L.E., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Duarte, M.C., Lage, D.P., Lima, M.I., de Jesus Pereira, N.C., Soto, M., Tavares, C.A., Goulart, L.R., Coelho, E.A. (2015). *Parasitology* **142**, 1335-1347.

Chávez-Fumagalli, M.A., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Coelho, C.S., Mendonça, D.V., Soto, M., Tavares, C.A., Faraco, A.A. and Coelho, E.A. (2015). *Rev Soc Bras Med Trop*. **48**, 235-242.

Martins, V.T., Duarte, M.C., Chávez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Coelho, C.S., de Magalhães-Soares, D.F., Fernandes, A.P., Soto, M., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2015). *Parasit Vectors*. **8**, 363.

de Jesus Pereira, N.C., Régis, W.C., Costa, L.E., de Oliveira, J.S., da Silva, A.G., Martins, V.T., Duarte, M.C., de Souza, J.R., Lage, P.S., Schneider, M.S., Melo, M.N., Soto, M., Soares, S.A., Tavares, C.A., Chávez-Fumagalli, M.A. and Coelho, E.A. (2015). *Exp Parasitol*. **153**, 180-190.

Pereira, L., Abbehusen, M., Teixeira, C., Cunha, J., Nascimento, I.P., Fukutani, K., Dos-Santos, W., Barral, A., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Soto, M. and Brodskyn, C.I. (2015). *PLoS Negl Trop Dis*. **10**, e0003490.

Requena, J.M., Montalvo, A.M., and Fraga, J. (2015). *Biomed. Res. Int*. 2015: 301326.

Iborra, S., Martínez-López, M., Cueto, F.J., Conde-Garrosa, R., del Fresno, C., Izquierdo, H.M., Abram, C.L., Mori, D., Campos-Martín, Y., Reguera, R.M., Kemp, B., Yamasaki, S., Robinson, M.J., Soto, M., Lowell, C.A. and Sancho, D. (2016). **45**, 788-801.

Duarte, M.C., Lage, D.P., Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Roatt, B.M., Menezes-Souza, D., Goulart, L.R., Soto, M., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2016). *Rev Soc Bras Med Trop*. **49**, 398-407.

Duarte, M.C., Tavares, G.S., Valadares, D.G., Lage, D.P., Ribeiro, T.G., Lage, L.M., Rodrigues, M.R., Faraco, A.A., Soto, M., da Silva, E.S., Chávez Fumagalli, M.A., Tavares, C.A., Leite, J.P., Oliveira, J.S., Castilho, R.O. and Coelho, E.A. (2016). *Exp Parasitol*. **166**, 21-28

Lage, D.P., Martins, V.T., Duarte, M.C., Costa, L.E., Garde, E., Dimer, L.M., Kursancew, A.C., Chávez-Fumagalli, M.A., de Magalhães-Soares, D.F., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Machado-de-Ávila, R.A., Soto, M., Tavares, C.A. and Coelho, E.A. (2016). *Parasitol. Res*. **115**, 1649-1658.

Coelho, E.A.F., Costa, L.E., Lage, D.P., Martins, V.T., Garde, E., Pereira, N.C.J., Lopes, E.G.P., Menezes-Borges, L.F.N., Duarte, M.C., Menezes-Souza, D., Magalhães-Soares, F.D., Chávez-Fumagalli, M.A., Soto, M. and Tavares, C.A.P. (2016). *Vet. Parasitol*. **215**, 63-71.

Martins, V.T., Lage, D.P., Duarte, M.C., Costa, L.E., Garde, E., Rodrigues, M.R., Chávez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Tavares, C.A.P., Soto, M., Coelho, E.A.F. (2016). *Acta Trop*. **154**, 73-81.

Alonso, G., Rastrojo, A., Lopez-Perez, S., Requena, J.M., and Aguado, B. (2016). *Parasites & Vectors* **9**, 74.

Fernandez-Orgiler, A., Martinez-Jimenez, M.I., Alonso, A., Alcolea, P.J., Requena, J.M., Thomas, M.C., Blanco, L., and Larraga, V. (2016). *Nucleic Acids Res* **44**, 4855-4870.

Lombraña, R., Alvarez, A., Fernandez-Justel, J.M., Almeida, R., Poza-Carrion, C., Gomes, F., Calzada, A., Requena, J.M., and Gomez, M. (2016). *Cell Rep* **16**, 1774-1786.

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

Postdoctorales /
Postdoctoral Fellows:
Iñaria Benedetti
Laura Mojardín Menéndez
(Hasta junio 2016)
Alicia del Prado Díaz
Isabel Holguera López
(Hasta diciembre 2015)
Modesto Redrejo Rodríguez

Predoctorales /
Predoctoral Students:
Mónica Berjón Otero
Pablo Gella Montero
(Hasta junio 2016)

Carlos David González Cencerrado
Ana Lechuga Mateo
M^a Eugenia Santos del Río
(Hasta marzo 2015)

Técnicos de Investigación /
Technical Assistance:
María José Bustos Sánchez
José M^a Lázaro Bolós
M^a Angeles Martínez Villarraso
Víctor Quiñones Acín
Laurentino Villar García
(Hasta agosto 2016)

Estudiantes /
Undergraduate Students:
Cristian Aparicio Maldonado
Juan Moreno González

Resumen de investigación

Hemos continuado con el estudio de la replicación del DNA de ø29 que se inicia mediante la proteína terminal (TP). Hemos diseccionado el papel de los residuos de unión al DNA de la TP en la replicación del DNA viral. Asimismo, hemos determinado que el residuo aromático Phe230 es uno de los determinantes que permiten el posicionamiento del penúltimo nucleótido en el sitio activo de polimerización para dirigir la inserción del dAMP iniciador. Hemos identificado un sitio en la TP que permite la inserción de péptidos de 17 aminoácidos manteniendo la capacidad de amplificación del DNA *in vitro*. En relación con la DNA polimerasa de ø29, en colaboración con el Dr. Borja Ibarra, hemos determinado el mecanismo de translocación durante la replicación procesiva del DNA. Además, hemos realizado un análisis transcripcional global de las interacciones virus-hospedador entre ø29 y *Bacillus subtilis*, encontrando genes que se sobreexpresan y otros en que su expresión disminuye. Por otra parte, hemos purificado y caracterizado la DNA polimerasa del fago Bam35, que infecta *Bacillus thuringiensis*, encontrando que es muy fiel y puede acoplar el desplazamiento de cadena a la síntesis procesiva del DNA. Además, tiene capacidad de síntesis translesión de sitios abásicos. También hemos caracterizado la TP de Bam35 y demostrado que se utiliza como “primer” en la iniciación de la replicación del DNA viral. En colaboración con la Dra. Nadine Fornelos, hemos determinado que la proteína gp7 del fago GIL01 de *B. thuringiensis* regula la transcripción interaccionando con el represor LexA bacteriano.

Hemos generado un recombinante del virus de la peste porcina africana (VPPA), del aislado BA71, deleciónado en el gen viral CD2v, homólogo al CD2 celular. Este recombinante, designado BA71ΔCD2, está altamente atenuado *in vivo* y ha demostrado conferir protección muy sólida contra el desafío experimental con aislados del VPPA letales homólogos y heterólogos.

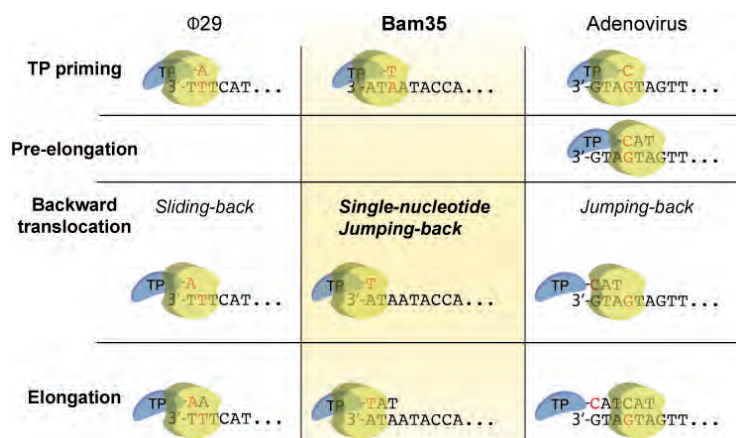


Figura 1. El bacteriófago Bam35 es un nuevo modelo para el estudio de la replicación del DNA que se inicia con proteína: pasos iniciales de la replicación del TP-DNA. Un nuevo modelo de “jumping back” de un único nucleótido está implicado en la replicación del genoma de Bam35, en comparación con el mecanismo de “sliding back” de ø29 y el de “jumping back” de adenovirus.

Figure 1. Bacteriophage Bam35 as a new working model for protein-primed DNA replication: early steps of TP-DNA replication. A novel single-nucleotide jumping back is involved in Bam35 genome replication (middle row), in comparison with ø29 sliding back and adenovirus jumping back.

Research summary

We have continued with the study of $\phi 29$ DNA replication initiated by TP-priming. We have dissected the role of the TP DNA binding residues in the replication of the viral DNA. Also, we have determined that the aromatic residue Phe230 is one of the determinants that allows the positioning of the penultimate nucleotide at the polymerization active site to direct insertion of the initiator dAMP. We have identified one site in the TP that allows the insertion of peptides up to 17 amino acids while maintaining the ability to support DNA amplification in vitro. In relation to the $\phi 29$ DNA polymerase, in collaboration with Dr. Borja Ibarra, we have determined the mechanism of translocation during processive DNA replication. Besides, we have carried out a global transcriptional analysis of virus-host interactions between $\phi 29$ and *Bacillus subtilis*, finding genes that are up-regulated and others that are down-regulated. On the other hand, we have purified and characterized the DNA polymerase of phage Bam35, that infects *Bacillus thuringiensis*, with the finding that it is a very faithful polymerase that can couple strand displacement to processive DNA synthesis. In addition, it is able to perform abasic sites translesion synthesis. We have also characterized the Bam35 TP and shown that it is used as primer in the initiation of replication of the viral DNA. In collaboration with Dr. Nadine Fornelos, we have shown that protein gp7 of the *B. thuringiensis* phage GIL01, regulates transcription interacting with the bacterial LexA repressor.

We have generated a recombinant of African swine fever virus (ASFV), BA71 isolate, that is deleted in the viral gene CD2v, homologous to the cellular CD2. This recombinant, designated BA71 Δ CD2, is highly attenuated in vivo and has demonstrated to confer very solid protection against experimental challenge with lethal homologous and heterologous ASF viruses.

Publicaciones / Publications

Mojardín, L., Botet, J., Moreno, S. and Salas, M. (2015). Chromosome segregation and organization are targets of 5'-Fluorouracil in eukaryotic cells. *Cell Cycle* **14**, 206-218.

Holguera, I., Muñoz-Espín, D. and Salas, M. (2015). Dissecting the role of DNA-binding residues of the $\phi 29$ terminal protein in viral DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **43**, 2790-801

Morin, A., Cao, F.J., Lázaro, J. M., Arias-Gonzalez, J.R., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J.L., Salas, M. and Ibarra, B. (2015). Mechano-chemical kinetics of DNA replication: identification of the translocation step of a replicative DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3643-3652.

Köhler, K., Duchardt-Fener, E., Lechner, M., Damm, K., Hoch, P.G., Salas, M. and Hartmann, R.K. (2015). Structural and mechanistic characterization of 6S RNA from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochimie* **117**, 72-86.

Berjón-Otero, M., Villar, L., de Vega, M., Salas, M. and Redrejo-Rodríguez, M. (2015). DNA polymerase from temperate phage Bam35 is endowed with processive polymerization and abasic sites translesion synthesis capacity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **112**, 3476-3484.

Fornelos, N., Butala, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Bamford, J. K. and Salas, M. (2015). Bacteriophage GIL01 gp7 interacts with host LexA repressor to enhance DNA binding and inhibit RecA-mediated autocleavage. *Nucleic Acids Res.* **43**, 7315-7319.

del Prado, A., Lázaro, J.M., Longás, E., Villar, L., de Vega M. and Salas, M. (2015). Insights into the determination of the templating nucleotide at the initiation of $\phi 29$ DNA replication. *J.Biol.Chem.* **290**, 27138-27145.

Salas, M., Holguera, I., Redrejo-Rodríguez, M. and de Vega, M. (2016). DNA-binding proteins essential for protein-primed bacteriophage $\phi 29$ DNA replication. *Frontiers in Molecular Biosciences.* **3**, 37.

Berjón-Otero, M., Villar, L., Salas, M. and Redrejo-Rodríguez, M. (2016). Disclosing early steps of protein-primed genome replication of the Grampositive tectivirus Bam35. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9733-9744

Mojardín L. and Salas, M. (2016). Global transcriptional analysis of virus-host interactions between phage $\phi 29$ and *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* **90**, 9293-9304.

Gella, P., Salas, M. and Mencía, M. (2016). Engineering permissive insertion sites in the bacteriophage Phi29 DNA-linked terminal protein. *PLoS One*, **11**, 164901.

Salas, M. (2016). My scientific life. *Bacteriophage* **6**, 1271250.

Suarez, C., Andrés, G., Kolovou, A., Hoppe, S., Salas, M. L., Walther, P. and Krijnse Locker, J. (2015). African swine fever virus assembles a single membrane derived from rupture of the endoplasmic reticulum. *Cellular Microbiol.* **17**, 1683-1698.

Lacasta, A., Monteagudo, P. L., Jiménez-Marín, A., Accensi, F., Ballesster, M., Argilaquet, J., Galindo, I., Segalés, J., Salas, M. L., Domínguez, J., Moreno, A., Garrido J. J. and Rodríguez, F. (2015) Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Veterinary Research* **46**,135.

Rodríguez, J. M., Moreno, L. T., Alejo, A., Lacasta, A., Rodríguez, F. and Salas, M. L. (2015) Genome sequence of African swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* **10**:e0142889.

Hernaez, B., Guerra, M., Salas, M. L. and Andrés, G. (2016) The uncoating of African swine fever virus: a stepwise disassembly process that culminates in inner envelope fusion at multivesicular endosomes. *PLoS Pathog* **12**:e105595.

Salas, M. and de Vega, M. (2016). Protein-primed replication of bacteriophage $\phi 29$ DNA. In: Laurie S. Kaguni and Marcos Túlio Oliveira, editors, *The Enzymes*, Vol. 39, Burlington: Academic Press, pp 137-167.

de Vega, M., Lázaro, J.M. and Salas, M. (2016). Improvement of $\phi 29$ DNA polymerase amplification performance by fusión of DNA binding motifs. *New Enzymes Useful in Rolling Circle Amplification (RCA)*. Springer, Demidov Ed. 10.1007/978-3-319-42226-8, pp 11-24.404.

Otras actividades / Other activities

Co-dirigió la asignatura de Estabilidad de Genomas: Replicación, Reparación y Mutagénesis del Master Biología Molecular y Celular englobado en el Programa Oficial de Posgrado de Biociencias Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid (2015-2016 y 2016-2017).

Co-dirigió el Curso "Biomedicina y Biotecnología en la era genómica" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo (2015).

Organizó la XIII y XIV Semana de la Ciencia del Ayuntamiento de Lurcar. Asturias 2015 y 2016.

Co-dirigió el Curso "La superación de la crisis a través de la Ciencia" de la Escuela de Biología Molecular "Eladio Viñuela". Universidad Internacional Menéndez Pelayo (2016).

Premios / Awards

Denominación "Margarita Salas" al Bulevar del Parque Tecnológico de Andalucía. Málaga (2015-).

Medalla de Honor de la Real Academia Nacional de Medicina (2015).

Denominación "Margarita Salas" al IES Sevilla Este. Sevilla (2016-).

Medalla Echegaray de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (2016).

Miembro del Consejo Rector de la Agencia Estatal de Investigación (2016-).

Tesis doctorales / Doctoral theses

Alicia del Prado Díaz (2015). Estudios estructurales y funcionales de la DNA polimerasa y la proteína terminal del bacteriófago phi29. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Margarita Salas y Miguel de Vega.

Isabel María Holguera López (2015). Estudio del dominio de unión a DNA de la proteína terminal del bacteriófago $\phi 29$ y su papel en la replicación del DNA viral. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Margarita Salas y Daniel Muñoz-Espín.

Pablo Gella Montero (2016). Optimización del sistema replicativo del bacteriófago phi29 para aplicaciones biotecnológicas. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Margarita Salas y Mario Mencía.

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

Alberto Jiménez Martín

Estudiantes / Undergraduate Students:

Ruth Gaspar Miguel

Paula González Fernández

Resumen de investigación

En nuestro laboratorio estudiamos los mecanismos implicados en la prevención de la inestabilidad genómica, una característica del cáncer y otras enfermedades, así como una de las causas del envejecimiento prematuro y de anomalías durante el desarrollo. Nuestro principal interés es comprender cómo se mantiene la estabilidad del genoma durante la replicación cromosómica, especialmente bajo condiciones de daño en el DNA. Las bases moleculares de estos procesos están conservadas evolutivamente, lo que nos permite utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

Durante este periodo hemos analizado la regulación de Mus81-Mms4/EME1 y otras endonucleasas específicas de estructura. Estas proteínas contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica mediante el procesamiento de intermediarios de DNA que se generan durante la reparación, recombinación o replicación del material genético. Hemos encontrado un nuevo modo de regulación de estas nucleasas, mediante el cual se acumulan y colocalizan en un nuevo tipo de focos subnucleares en respuesta a la presencia de daño en el DNA. El reclutamiento de las endonucleasas en estos sitios se produce por relocalización dentro de la cromatina y es importante para la función de las mismas.

Hemos continuado también el estudio de la regulación y función de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA. Esta ruta permite a las células hacer frente a las lesiones no reparadas en el DNA que impiden la progresión de las horquillas de replicación, facilitando que la duplicación del genoma se complete en cada ciclo celular. Hemos mostrado que la tolerancia al daño en el DNA durante la replicación se lleva a cabo principalmente mediante un mecanismo libre de errores mediado por Rad51/HLTF. Asimismo, hemos encontrado que Mgs1/WRINP1, una ATPasa de la familia AAA+, es un modulador de la ruta *RAD6/RAD18* que favorece el intercambio de molde para el baipás de las lesiones en el DNA.

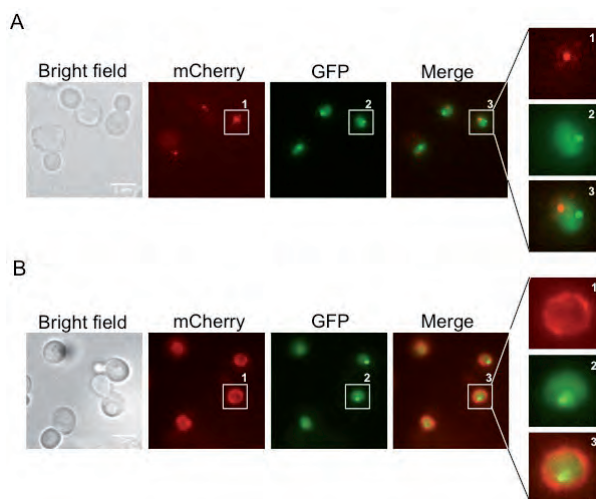


Figura 1. Microscopía de fluorescencia. (A) Localización de diferentes proteínas de reparación en distintos focos nucleares inducidos por daño en el DNA. (B) Localización de focos de reparación del DNA con respecto a la membrana nuclear.

Figure 1. Fluorescence microscopy. (A) Localization of different repair proteins at distinct DNA damage-induced nuclear foci. (B) Localization of DNA repair foci with respect to the nuclear envelope.

Research summary

*In our lab we study the mechanisms involved in the prevention of genomic instability, a hallmark of cancer and other diseases, as well as one of the causes of premature ageing and developmental abnormalities. Our main interest is to understand how genome stability is maintained during chromosome replication, especially under conditions of DNA damage. The molecular bases of these processes are evolutionarily conserved, which allows us to use the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism.*

During this period we have analysed the regulation of Mus81-Mms4/EME1 and other structure-specific endonucleases. These proteins contribute to the maintenance of genomic integrity by processing DNA intermediates that are generated during DNA repair, recombination or replication. We have uncovered a new mode of regulation of these nucleases, whereby they accumulate and colocalize into a new class of subnuclear foci in response to the presence of DNA damage. The recruitment of these proteins into these sites occurs by relocalization within the chromatin and is important for their function.

We have also continued the study of the regulation and function of the RAD6/RAD18 pathway of DNA damage tolerance. This pathway allows cells to overcome unrepaired DNA lesions that hinder the progression of replication forks, thus facilitating genome duplication in every cell cycle. We have shown that tolerance to DNA damage during replication is mainly carried out by an error-free mechanism that is mediated by Rad5/HLTF. Likewise, we have found that Mgs1/WRINP1, a DNA-dependent AAA+ ATPase, is a modulator of the RAD6/RAD18 pathway that favours template switching for DNA lesions bypass.

Publicaciones / Publications

Morafraila, E. C., Diffley, J. F., Tercero, J. A.* and Segurado, M.*
(2015) Checkpoint-dependent RNR induction promotes fork restart after replicative stress. *Sci. Rep.* **5**, 7886.

* Corresponding authors

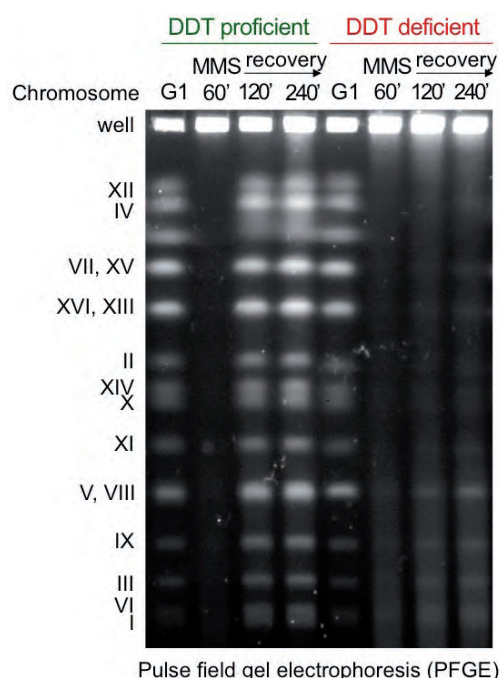
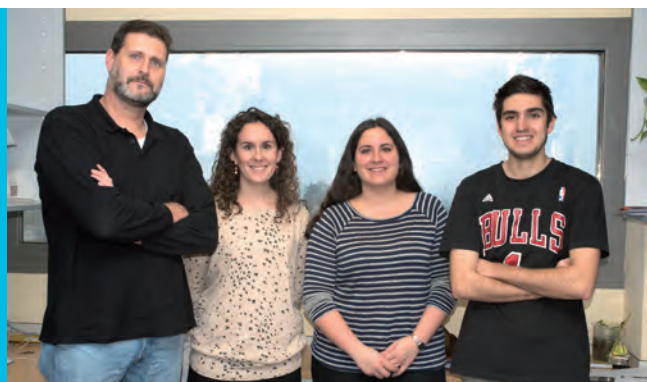


Figura 2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) mostrando que los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA (DDT) son necesarios para completar la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético.

Figure 2. Pulse field electrophoresis (PFGE) showing that DNA damage tolerance mechanisms (DDT) are necessary to complete chromosome replication in the presence of DNA lesions.

Grupo Reparación del DNA bacteriano

Bacterial DNA repair



Jefe de Línea / Group Leader:

Miguel de Vega José

Postdoctorales / Postdoctoral Fellows:

Olga Zafra Amorós

Becarios Predoctorales /

Graduate Students:

Ana de Ory López

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Lucía Pérez de Ayala

José Luis Fernández García

Guillermo Rodríguez Alonso

Resumen de investigación

Nuestro principal objetivo es el estudio a nivel molecular de las proteínas responsables de la estabilidad genética en bacterias utilizando como modelo las de la bacteria *Bacillus subtilis*, cuyas células vegetativas y esporas están expuestas a condiciones medioambientales extremas, causantes de múltiples daños en el DNA. De entre ellos, uno de los más frecuentes es la generación de sitios abásicos (sitios AP) cuya reparación se lleva a cabo mediante la ruta de reparación por escisión de bases (BER). Así, el sitio AP es hidrolizado por una AP endonucleasa, generándose una discontinuidad en el ADN con un extremo 5'-dRP que es eliminado por una actividad liasa. El pequeño hueco resultante es rellenado por una ADN polimerasa que restaura el nucleótido original. Finalmente, los extremos son ligados por una ADN ligasa. Hasta ahora, estas actividades parecían residir en proteínas independientes.

Mediante ensayos *in vitro* hemos demostrado como la Ligasa D de *B. subtilis* (BsuLigD), que junto con la proteína Ku constituyen un sistema de reparación de roturas de DNA, además de poseer actividades de polimerización y ligación, presenta una actividad liasa, capaz de eliminar los grupos 5'-dRP que surgen durante la reparación de sitios AP. Por lo tanto, BsuLigD es capaz por sí sola de reconocer el nick generado por una AP endonucleasa, rellenar el hueco resultante, restaurando el nucleótido original, sanear los extremos 5'-dRP y finalmente sellar las dos cadenas de ADN. Hemos mostrado como esta nueva actividad es general de las proteínas LigD ya que tanto BsuLigD como la LigD de *Pseudomonas aeruginosa* la poseen. Además, hemos demostrado *in vivo* la importancia de dicha actividad, ya que esporas de *B. subtilis* carentes de BsuLigD y sometidas a daño oxidativo (que es fundamentalmente reparado por la vía BER) presentan una caída drástica de la viabilidad celular. Estos resultados expanden la intervención de esta proteína en diferentes vías de reparación, haciendo que sea una potencial diana terapéutica para la generación de inhibidores de este enzima que podrían conducir a la muerte bacteriana.

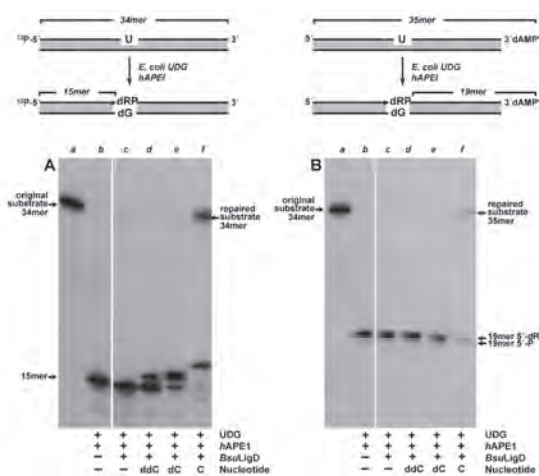


Figura 1. La LigD de *Bacillus subtilis* lleva a cabo la reparación completa de un sustrato intermediario tipo BER (Base Excision Repair). Parte Superior; representación esquemática de la obtención de un sustrato tipo BER. Parte inferior; autorradiografías que muestran la capacidad de la LigD de eliminar el extremo dañado 5'-dRP por su actividad 5'-dRP liasa, rellenar el gap generado mediante la adición de nucleótidos complementarios gracias a la actividad polimerasa y finalmente sellar el nick resultante gracias a su actividad ligasa.

Figure 1. *Bacillus subtilis* Ligase D accomplishes the complete repair of a Base Excision Repair (BER) intermediate. Top; schematic representation of the formation of a BER substrate. Bottom; autodiagrams showing the ability of LigD to release the damaged 5'-dRP end by the 5'-dRP lyase activity, to fill the gap by adding complementary nucleotides by the polymerization activity and finally to seal the resulting nick by the ligase activity.

Research summary

Our main objective is the study at a molecular level of the proteins responsible for genetic stability in bacteria, using as model those from the bacterium *Bacillus subtilis* whose vegetative cells and spores are exposed to extreme environmental conditions that cause multiple lesion in DNA. The abasic sites (AP sites) are the most frequent lesions in DNA and are repaired by the base excision repair pathway (BER). Thus, the AP site is hydrolyzed by an AP endonuclease that introduces a nick flanked by a 5'-dRP terminus that has to be released by a lyase activity to allow further sealing. The resulting gap is filled by a DNA polymerase that restores the original nucleotide. Finally, the ends are ligated by a DNA ligase. Usually, those activities are catalyzed by standalone proteins.

By *in vitro* assays, we have demonstrated that Ligase D from *B. subtilis* (BsuLigD) that together with Ku constitute a double stranded DNA breaks pathway, in addition to inherent polymerization and ligase is endowed with a lyase activity able to release the 5'-dRP groups that arise during the repair of the AP sites. Therefore, BsuLigD is able to recognize the nick generated by the AP endonuclease, to fill the resulting gap restoring the original (no damaged) nucleotide, to sanitize the 5'-dRP termini and finally to ligate the two DNA strands. We have shown that this activity is present also in the LigD from the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. We have demonstrated *in vivo* the importance of such an activity as *B. subtilis* spores lacking BsuLigD and subjected to oxidative damage (that is repaired principally by BER) exhibit an important decrease in cellular viability. These results expand the role of LigD to other DNA repair pathways, being a potential therapeutic target for generating inhibitors of this enzyme that could lead to cell death.

Publicaciones / Publications

Berjón-Otero, M., Villar, L., de Vega, M., Salas, M. and Redrejo-Rodríguez, M. (2015) DNA polymerase from temperate phage Bam35 is endowed with processive polymerization and abasic sites translesion synthesis capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **112**, E3476-3484.

del Prado, A., Lázaro, J.M., Longás, E., Villar, L., de Vega, M. and Salas, M. (2015) Insights into the determination of the templating nucleotide at the initiation of ϕ 29 DNA replication. *J. Biol. Chem.* **290**, 27138-27145.

de Ory, A., Nagler, K., Carrasco, B., Raguse, M., Zafra, O., Moeller, R. and de Vega, M. (2016) Identification of a conserved 5'-dRP Lyase Activity in Bacterial DNA Repair Ligase D and Its Potential Role in Base Excision Repair. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1833-1844.

Salas, M., Holguera, I., Redrejo-Rodríguez, M. and de Vega, M. (2016) DNA-Binding Proteins Essential for Protein-Primed Bacteriophage ϕ 29 DNA Replication. *Front. Mol. Biosci.* **3**, Artículo 37.

Salas, M. and M. de Vega (2016) Protein-Primed Replication of Bacteriophage ϕ 29 DNA. In Laurie K. Kaguni and M. Túlio Oliveira (ed.) DNA replication along Taxa (Series Enzymes) Elsevier Inc. *Academic Press, Burlington*. Vol. 39, 137-167.

de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. (2016) Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. In Vadim Demidov (ed.) Rolling Circle Amplification (RCA): Toward New Clinical Diagnostics and Therapeutics. Springer, Switzerland, pp.11-24.

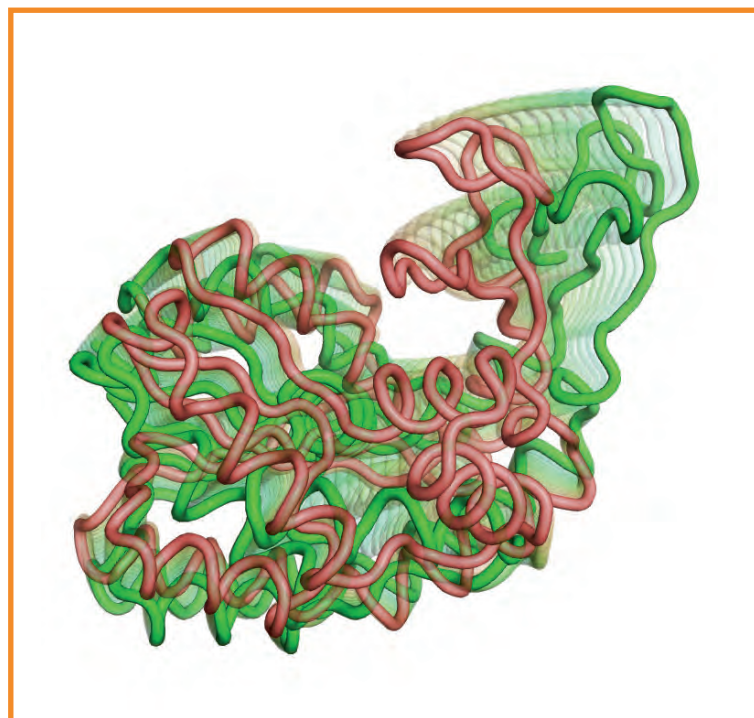
Tesis doctorales / Doctoral theses

Alicia del Prado Díaz (2015). Estudios estructurales y funcionales de la DNA polimerasa y la proteína terminal del bacteriófago ϕ 29. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Miguel de Vega y Margarita Salas.

Ana de Ory López (2016). Análisis bioquímico de las proteínas de reparación del DNA ku y Ligasa D de *Bacillus subtilis*. Universidad Autónoma de Madrid. Director: Miguel de Vega.

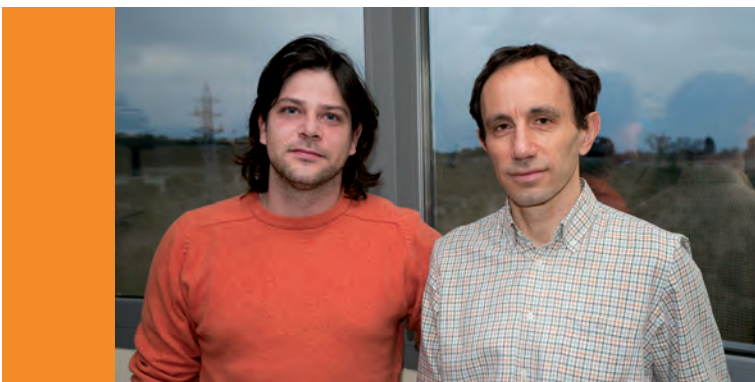
Unidad de Bioinformática

Bioinformatics Unit



BIOLOGÍA COMPUTACIONAL Y BIOINFORMÁTICA

COMPUTATIONAL BIOLOGY AND BIOINFORMATICS



Jefe de Unidad / Unit Leader:

Ugo Bastolla Bufalini

Técnico de Investigación /

Technical Assistance:

Alfonso Núñez Salgado

Estudiantes /

Undergraduate Students:

Carlos Rodríguez Cáceres

Daniel Ortíz

Pavel Baykalov

Resumen de investigación

Nuestra línea principal consiste en combinar la evolución molecular con modelos sencillos de la estabilidad de las proteínas. En este contexto, hemos desarrollado el modelo Mean-Field de evolución de proteínas con selección sobre su estabilidad de plegamiento (Ref.1) y lo hemos aplicado a reconstruir secuencias ancestrales de proteínas y predecir su estabilidad (artículo aceptado), a predecir las tasas de sustitución en diferente posiciones de la proteína y a predecir las correlaciones evolutivas entre posiciones con aplicación a la predicción de estructura (trabajos en curso). En colaboración con el grupo de Esteban Domingo, estamos analizando como los cambios en el proceso de mutación influyen sobre la estabilidad de las proteínas virales mutantes (en revisión). Finalmente, estamos caracterizando cómo las inserciones y eliminaciones están acoplados con las sustituciones de nucleótidos.

En la línea de nuestro modelo de red elástica de ángulos de torsión para calcular la dinámica de proteínas, hemos desarrollado un nuevo método de regresión para calibrar su constante de fuerza (en revisión) y para describir cambios de conformación mediante ángulos de torsión, hemos realizado un servidor de cálculo, y hemos aplicado el modelo a calcular los acoplamientos dinámicos entre residuos y a descomponer la proteína en módulos dinámicos.

En colaboración con el grupo de Crisanto Gutierrez, estamos analizando los orígenes de replicación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y su correlación con los estados de la cromatina y con motivos de secuencia, en particular el GCskew.

Finalmente, seguimos trabajando en ecología teórica, preguntandonos qué determina la estabilidad estructural de los ecosistemas mediante nuestro formalismo de la competición efectiva. Hemos demostrado que esta determina la estabilidad dinámica global, y que las interacciones mutualistas disminuyen la competición efectiva solo cuando la competición directa es débil (artículos publicados en 2017). Esta línea nos ha llevado a caracterizar las redes de interacciones ecológicas entre bacterias, en colaboración con Fernando Puente y Javier Tamames (CNB).



Figura 1. Reconstrucción de las secuencias y de las estabildades de proteínas ancestrales de la familia D-Alanina-D-Alanina ligasa usando nuestro modelo mean-field de evolución molecular y nuestro programa DeltaGREM.

Figure 1. Reconstruction of sequence and predicted folding stability of the ancestral nodes of the protein family D-Alanine-D-Alanine-ligase, using our mean-field model of molecular evolution and our program DeltaGREM.

Research summary

Our main research line consists in combining molecular evolution with simple models of protein folding stability. In this context, we developed the Mean-Field model of protein evolution with selection on stability (Ref.1) and we applied it to reconstruct ancestral protein sequences and their stability (accepted paper), to predict site-specific substitution rates and to predict evolutionary correlations between protein sites to contribute to protein structure prediction (work in course). In collaboration with the group of Esteban Domingo, we are analysing how changes in the mutation process affect the stability of mutant viral proteins (under review). Finally, we are characterizing how insertions and deletions are coupled with the substitution process.

In the line of our elastic network model of torsion angles that we use to predict protein dynamics, we developed a new regression method to calibrate the force constant (under review) and to describe conformation changes through torsion angles, we implemented a web server for computations, and we applied the model to predict dynamical couplings between residues and to decompose the protein into dynamical modules.

In collaboration with the group of Crisanto Gutierrez, we analysed the replication origins of the *Arabidopsis thaliana* genome and their correlation with chromatin states and with sequence motifs, in particular the GCskew.

Finally, we continue working in theoretical ecology, in particular addressing the determinants of the structural stability of ecosystems through our formalism of the effective competition. We showed that it determines the global dynamical stability of model ecosystems, and that mutualistic interactions decrease the effective competition only when the direct competition is weak (papers published in 2017). This line lead us to characterize ecological interactions among bacteria, in collaboration with Fernando Puente and Javier Tamames (CNB).

Publicaciones / Publications

Arenas, M., Sánchez-Cobos, A. and Bastolla, U. (2015) Maximum-Likelihood Phylogenetic Inference with Selection on Protein Folding Stability. *Mol Biol Evol.* **32**:2195-207.

Nido, G.S., Bachschmid-Romano, L., Bastolla, U. and Pascual-García, A. (2016) Learning structural bioinformatics and evolution with a snake puzzle. *PeerJ Computer Science* **2**:e100.

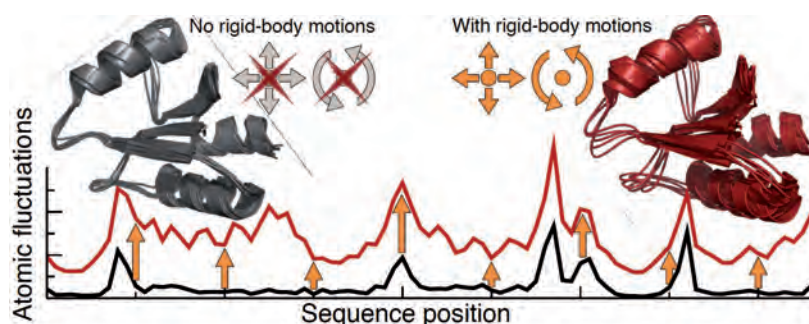


Figura 2. Calibración del modelo de dinámica de proteínas como red elástica de ángulos de torsión. El modelo predice los movimientos internos (línea negra) y con estos se ajustan las fluctuaciones observadas en experimentos de rayos X (línea roja), que consisten también en movimientos de cuerpo rígido. Hemos desarrollado un nuevo método para regularizar ajustes con variables muy correlacionados como éste.

Figure 2. Calibration of the torsional elastic network model of protein dynamics. The model predicts the internal motions of the protein (black line), and with these we fit the fluctuations observed in X-ray experiments (red line), that also consist of rigid body motions. We developed a new method to regularise fits that involve very correlated variables like this one.



176

**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

Responsable Técnico /
Technical Director:
Almudena Hernando

Personal Científico /
Scientific Staff:
Raquel Bello-Morales

Colaboradores / *Collaborators:*
Begoña Aguado
Elena Campos
Flores Cavodeassi
Beatriz Praena
Mar Ruiz

<http://www.cbm.uam.es/ccientifica>

Actividades

Dentro del programa de Divulgación y Fomento de la Ciencia, el Departamento de Cultura Científica (DCC) del CBMSO ha participado en las siguientes actividades 2015-2016: 1) Semana de la Ciencia de Madrid. 2) Participación en la Noche de los Investigadores 2015. 3) Programa de 15 visitas guiadas -unos 600 alumnos anuales- al CBMSO para estudiantes preuniversitarios. 4) Blog Bio(Ciencia+Tecnología) de la Fundación Madri+d. 5) Redes Sociales: Facebook y Twitter. 6) Página Web Institucional del DCC. 7) Elaboración de una página semanal de difusión científica. 8) Organización de los cursos de biotecnología "Biotechnology Explorer" para profesores de secundaria. 9) Programa Educativo 4ESO+EMPRESA de la Comunidad de Madrid. 10) Estancia en el CBMSO de Alumnos Finalistas de la Olimpiada Española de Biología.

Participación en los medios de comunicación sobre divulgación científica: Mi+dTV y UNEDtv (TVE-La2) "Tres noticias en tres minutos en TV"; Radio Nacional de España (Radio 5 -"Entre Probetas" y "El Laboratorio de JAL"-, Radio 1 -"A Hombros de Gigantes"- y Radio Exterior -"Marca España"-); programa de Antena 3TV "Mitos alimenticios"; el suplemento "El Cultural" y la revista de cultura científica *Principia* (prensa escrita).

Investigación

El grupo de NeuroVirología (UAM) está estudiando el papel de la infección por virus HSV-1 en neurodegeneración, desmielinización y nuevos antiherpéticos en células oligodendrocíticas inmaduras o diferenciadas a células productoras de Mielina. Se han descrito varios receptores celulares para la entrada viral, aunque otras observaciones sugieren que podrían existir más moléculas para dicho acceso al interior celular por parte de HSV-1. Se propone un nuevo papel para la proteína proteolípica (PLP) en la entrada de HSV-1 en la línea de células oligodendrocíticas humanas HOG. Por otra parte, los resultados muestran cómo el tratamiento con VPA de las células HOG reduce significativamente el efecto de la infección por HSV-1, la entrada viral y su productividad sin afectar a la viabilidad celular.



Figura 1. Participación en la XIII Semana de la Ciencia de Lueca, Asturias 2015

Figure 1. Participation in XIII Scientific Weeks in Lueca, Asturias, 2015

Activities

Within the framework of the CBMSO Scientific Culture Program, The Department of Scientific Culture (DCC) of the CBMSO has collaborated in the following activities 2015-2016: 1) Scientific Weeks in Madrid. 2) Participation in the European Researchers' Night 2015. 3) Annual program of 15 guided visits of Secondary School students –about 600 students- to our Research Centre. 4) Weblog “Bio(Ciencia+Tecnología)” of the Madri+d Foundation (<https://goo.gl/JYocHc>). 5) Social Networks: Facebook and Twitter. 6) Institutional Website of our DCC (<https://goo.gl/FBv2eZ>). 7) Weekly-updated Institutional Website about Social Communication of Science (<https://goo.gl/XUqFVx>). 8) Organization and coordination of the “Biotechnology Explorer” courses for secondary school teachers (<https://goo.gl/62mq8h>). 9) Educational Program “4ESO + EMPRESA” of the Community of Madrid. 10) Stay at the CBMSO of the Students “Finalist of the Spanish Biology Olympiad”.

Participation in Mass Media about Scientific Dissemination and Disclosure: Mi+dTV and UNEDtv (TVE-La2) “3x3 TV news”; Spanish National Radio (Radio 5 –“Entre Probetas” and “El Laboratorio de JAL”-, Radio 1 –“A Hombros de Gigantes- and Radio Exterior –“Marca España”-); Participation in the Antena 3TV program “Food myths”; Collaborations with the magazines of scientific culture “El Cultural” and “Principia” (<https://goo.gl/SsVXC>).

Research

The NeuroVirology (UAM) group aims at the study of the effect of HSV-1 on neurodegeneration, demyelinating disease and new antiherpetic compounds in both immature and differentiated myelin-producing oligodendrocytic cells. Several cell receptors for viral entry have been described, but others observations suggest that more receptors for HSV-1 might exist. A novel role for the proteolipid protein (PLP) in HSV-1 entry into the human oligodendrocytic cell line HOG has been proposed. On the other hand, It has been characterized the effect of Valproic acid (VPA) on this HSV-1 infection of HOG cells, The results indicate that VPA treatment of HOG cells significantly reduces the effect of HSV-1 infection, virus entry and productivity without affecting cellular viability.

Publicaciones / Publications

Bello-Morales, R., Crespillo A.J., Praena, B., Tabarés, E., Revilla, Y., García, E., Fraile-Ramos, A., Baron, W., Krummenacher, C. and López-Guerrero J.A. (2016) Role of Proteolipid Protein in HSV-1 Entry in Oligodendrocytic Cells. *PLoS One* **11**:e0147885

Crespillo, A.J., Praena, B., Bello-Morales, R., Lerma, L., Vázquez-Calvo, A., Martín-Acebes, M.A., Tabarés, E., Sobrino, F. and López-Guerrero J.A. (2016) Inhibition of herpes virus infection in oligodendrocyte cultured cells by valproic acid. *Virus Res.* **214**, 71-79.

Matesanz, F., Fedetz, M., Barrionuevo, C., Karaky, M., Catalá-Rabasa, A., Potenciano, V., Bello-Morales, R., López-Guerrero, J.A. and Alcina A. (2016) A splice variant in the ACSL5 gene relates migraine with fatty acid activation in mitochondria. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 1572-1577.

Comunicación social de la Ciencia/Social communication of science:

1. López Guerrero, J.A. (2015) Enseñanza y difusión de la virología. *Virología* **18**, 31-33.
2. López Guerrero, J.A. (2015) Vacúnate contra el papiloma. *Principia* **1**, 60-61
3. López-Guerrero, J.A. (2016) Crisis española con el virus Crimea-Congo. *Virología* **19**, 19-20.
4. López-Guerrero, J.A. (2016) 41st Annual International Herpesvirus Workshop (IHW2016). *Virología* **19**, 34-35.

López-Guerrero, J.A. *El Cultural*:

- 24/04/2015 “Ya está aquí la revolución molecular”
- 03/07/2015 “Vacuas y contravacunas”
- 25/09/2015 “Pelos, perros y una pareja de hecho”
- 24/12/2015 “Hitos del 2015”
- 30/12/2016 “Hitos del 2016”

Premios / Awards

2016: Premio Especial del Jurado “Ciencia en Acción”/ Special Jury Prize “Science in Action”

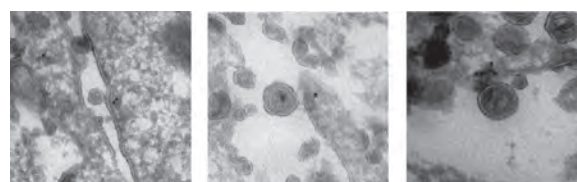


Figura 2. Electroinmunomicroscopía de PLP-EGFP y HSV-1. *PLoS One* **11**(1):e0147885.

Figure 2. EM immunocolocalization of PLP-EGFP and HSV-1. *PLoS One* **11**(1):e0147885.



10 Servicios Científicos / 10 Scientific Facilities

- 180 SERVICIO DE ANIMALARIO**
ANIMAL FACILITY
Elena Hevia Hernández
- 181 SERVICIO DE BIOINFORMÁTICA**
BIOINFORMATICS FACILITY
David Abia Holgado
- 182 SERVICIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO**
FLOW CYTOMETRY FACILITY
Berta Raposo Ponce
- 183 SERVICIO DE FERMENTACIÓN**
FERMENTATION FACILITY
Dionisio Ureña Rodríguez
- 184 SERVICIO DE GENÓMICA Y SECUENCIACIÓN MASIVA**
GENOMICS AND NEXT-GENERATION SEQUENCING FACILITY
Fernando Carrasco Ramiro



Servicios Científicos

Scientific Facilities

- 185** **SERVICIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (SME)**
ELECTRON MICROSCOPY FACILITY (EMF)
María Teresa Rejas Marco
- 186** **SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL (SMOC)**
OPTICAL AND CONFOCAL MICROSCOPY CORE FACILITY (SMOC)
Carlos Sánchez Martín / Ángeles Muñoz Alcalá
- 187** **SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS Y PROTEÓMICA**
PROTEOMICS AND PROTEIN CHEMISTRY CORE FACILITY
Ana Isabel Marina Ramírez
- 188** **SERVICIO DE TRANSGÉNESIS**
TRANSGENESIS FACILITY
M^a Belén Pintado Sanjuanbenito
- 189** **SERVICIO DE TRANSGÉNESIS DE DROSOPHILA**
DROSOPHILA TRANSGENESIS FACILITY
Eva Caminero Jiménez / Mar Casado García

SERVICIO DE ANIMALARIO

ANIMAL FACILITY



Descripción

Es una instalación moderna, diseñada y equipada con los últimos avances en este tipo de instalaciones y su finalidad es la producción y mantenimiento de roedores y de especies acuáticas (peces cebra, medakas y xenopus) en condiciones óptimas para su utilización en los proyectos que se desarrollan en el Centro.

La instalación dispone entre otras de:

- Zona SPF (Specific Pathogen Free) donde se producen las líneas de ratones modificados genéticamente.
- Zona convencional o de experimentación.
- Zonas con Nivel 2 de Biocontención (NSB 2), para ratón y rata.
- Zona con Nivel 3 de Biocontención (NSB 3), para ratones.
- Zona para el mantenimiento de animales acuáticos.
- Laboratorios/ Quirófanos/ Salas de comportamiento/ Cuarentenas.

De forma regular se organizan seminarios sobre materias relacionadas con el animal de laboratorio para la formación continua tanto de usuarios como del personal.

Nuestro objetivo es la buena salud y el bienestar de los animales.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

Servicios internos que ofrece el Animalario:

Rederivación de líneas de ratones modificados genéticamente para su introducción a la zona de barrera

Criopreservación de embriones y gametos de ratón

Mantenimiento y producción de ratones en condiciones SPF, NSB2, NSB3 y convencionales

Mantenimiento de ratas en condiciones convencionales y NSB2

Mantenimiento y producción de peces cebra y medakas

Mantenimiento de ranas Xenopus

Gestión de colonias de ratones transgénicos

Producción de gestantes de fecha conocida

Diversos tipos de administraciones y extracciones

Apoyo y asesoramiento técnico a los investigadores

Controles sanitarios trimestrales de los animales, realizados de forma externa, y siguiendo las recomendaciones de FELASA

Director Técnico /
Technical Director:
Dra. Elena Hevia Hernández

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. César Coboleda Hernández

Asesor Veterinario en Salud Animal /
Animal Health Veterinary Advisor:
Dra. Elena Hevia Hernández

Responsable de Bienestar /
Welfare Supervisor:
Fernando Núñez Martín

Personal Técnico /
Technical Support:
José María Sedano Torres
Laura López Martínez

Marta González Mella
Macarena Quesada López
Beatriz García Martínez
Virginia González de la Torre
(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

Personal de apoyo de la
empresa Vivotécnia /
Support staff of the Company
Vivotecnía

Página Web / Web page:
<http://www.cbm.uam.es/animalario>

Description

It is a modern facility, designed and equipped with the latest advances in this type of facilities and its purpose is the production and maintenance of rodents and aquatic species (zebrafish, medakas and xenopus) under optimum conditions for use in the projects developed in the Center.

The installation also includes:

- SPF (Specific Pathogen Free) zone where the lines of genetically modified mice are produced
- Conventional or experimental zone
- Zones with Biocontainment Level 2 (NSB 2), for mouse and rat
- Zone 3 with Biocontainment (NSB 3), for mice
- Zone for the maintenance of aquatic animals
- Laboratories / Operating Rooms / Behavior Rooms / Quarantines

On a regular basis, seminars are organized on subjects related to laboratory animals for the continuous training of both users and staff

Our goal is good health and animal welfare

SERVICES

Internal services offered by Animal facility:

Rederivation of genetically modified lines of mice for introduction into the barrier zone

Cryopreservation of mouse embryos and gametes

Maintenance and production of mice under SPF, BDL2, BSL3 and conventional conditions

Maintenance of rats under conventional conditions and BSL2.

Maintenance and production of zebrafish and medakas

Maintenance of Xenopus frogs

Management of colonies of transgenic mice

Production of pregnant females of rodents with known date.

Various types of administrations and extractions

Support and technical advice to researchers

Quarterly animal health checks externally, following the recommendations of FELASA

Training of animal staff and users

SERVICIO DE BIOINFORMÁTICA

BIOINFORMATICS FACILITY

Director Técnico /

Technical Director:

David Abia Holgado

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

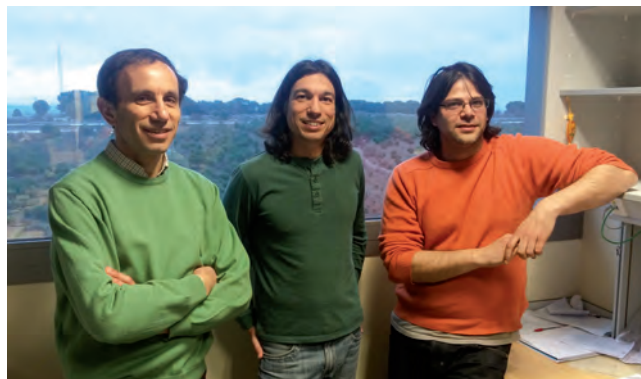
Dr. Ugo Bastolla Bufalini

Personal / *Personnel:*

Alfonso Núñez Salgado

Página Web / *Web page:*

<http://ub.cbm.uam.es>



Descripción

El objetivo del Servicio de Bioinformática es dar soporte, principalmente a los grupos de investigación del CBMSO, en el análisis bioinformático de los datos que generan, en realizar predicciones que guíen sus investigaciones y en asesorar sobre los aspectos computacionales de sus proyectos de investigación. Adicionalmente imparte cursos a través del programa de formación del CSIC, participa en la formación de estudiantes de máster y administra los recursos informáticos científicos del CBM-SO, gestionando el cluster de cómputo, así como el software y bases de datos instaladas en el mismo.

Hoy en día los experimentos biológicos generan una gran cantidad de datos que es necesario analizar mediante herramientas bioinformáticas para poder extraer la información de interés y por otro lado, los resultados experimentales hay que complementarlos con análisis y predicciones bioinformáticas, que ayudan a su racionalización, para poder publicarlos en revistas con un alto índice de impacto. Además, es posible obtener resultados de forma más rápida y económica si los experimentos de laboratorio van guiados por predicciones "in silico", en vez de por intuición o fuerza bruta. Estos análisis y predicciones se hacen mediante programas creados por terceros o mediante programas desarrollados a medida del problema, que corren en ordenadores personales o en la infraestructura de cálculo del Servicio. Esta infraestructura es usada tanto por el personal del Servicio, como por el de otros servicios (en especial el de Genómica y Secuenciación Masiva), así como por el personal de los laboratorios de los diferentes departamentos.

Las prestaciones principales del Servicio se centran en el análisis de proteínas, a nivel de secuencia (búsqueda de homólogos, caracterización de familias, predicción de propiedades) y estructura (modelado de proteínas no cristalizadas o de mutantes, caracterización de interacciones mediante simulaciones de dinámica molecular). Mantenimiento del cluster y atención a sus usuarios, formándoles en su uso, instalando programas, actualizando bases de datos, y escribiendo programas para el procesamiento de sus datos.

Description

The objective of the Bioinformatics Facility is to provide support, mainly to the research groups of the CBMSO, in the bioinformatics analysis of the data they generate, to make predictions to guide their research and to advise them on the computational aspects of their research projects. In addition, the personnel teaches courses through the CSIC training program, participates in the training of master students and administers the scientific computing resources of the CBM-SO, managing the computation cluster, as well as the software and databases installed on it.

Nowadays biological experiments generate a large amount of data that needs to be analyzed through bioinformatic tools to extract the information of interest and on the other hand, the experimental results must be complemented with bioinformatic analyzes and predictions, which help to rationalize them, so they can be published in journals with a high impact index. In addition, it is possible to obtain results more quickly and economically if laboratory experiments are guided by predictions "in silico", rather than by intuition or brute force. These analyzes and predictions are done through programs created by third parties or through programs developed to the extent of the problem, which run on personal computers or in the computing infrastructure of the Service. This infrastructure is used by both the Service staff and other services (especially the Genomics and Mass Sequencing), as well as by the staff of the laboratories of the different departments.

The main functions of the Service are the analysis of proteins at the sequence level (homologous search, family characterization, prediction of properties) and structure level (modeling of non-crystallized or mutant proteins and characterization of interactions using molecular dynamics). Additionally it maintains the computation cluster and attends to its users, training them in their use, installing programs, updating databases, and writing programs for the processing of their data.

Publicaciones / Publications

Kateřina Havlová, Martina Dvořáková, Ramon Peiro, David Abia, Iva Mozgová, Lenka Vansáčková, Crisanto Gutierrez, Jiří Fajkus (2016) *Plant molecular biology*, **92**, 4-5, 457-471

Verónica Martín, Celia Perales, María Fernández-Algar, Helena G Dos Santos, Patricia Garrido, María Pernas, Víctor Parro, Miguel Moreno, Javier García-Pérez, José Alcamí, José Luis Torán, David Abia, Esteban Domingo, Carlos Briones (2016). *PLoS one*, **11**, 12, e0166902

Aldo Borroto, Diana Reyes-Garau, M Angeles Jiménez, Esther Carrasco, Beatriz Moreno, Sara Martínez-Pasamar, José R Cortés, Almudena Perona, David Abia, Soledad Blanco, Manuel Fuentes, Irene Arellano, Juan Lobo, Haleh Heidarieh, Javier Rueda, Pilar Esteve, Danay Cibrián, Ana Martínez-Riaño, Pilar Mendoza, Cristina Prieto, Enrique Calleja, Clara L Oeste, Alberto Orfao, Manuel Fresno, Francisco Sánchez-Madrid, Antonio Alcamí, Paola Bovolenta, Pilar Martín, Pablo Villoslada, Antonio Morreale, Angel Messeguer, Balbino Alarcon (2016). *Science Translational Medicine*, **8**, 370, 370ra184

Ferrera, A., Pascual-García, A. & Bastolla, U. Effective competition determines the global stability of model ecosystems (2016). *Theor Ecol.*

Patentes / Patents

Luis Menéndez Arias, Tania Matamoros Grande, David Abia Holgado, Verónica Barrioluengo Fernández, Verónica Barrioluengo Fernández. HIV type 1 group O reverse transcriptases that are active at high temperatures. US. 2016/8/30. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

SERVICIO DE 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
Dra. Raquel Nieto Pintado

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 mediante técnicas de citometría de flujo utilizando diversos parámetros celulares. También se realizan separaciones celulares ("cell sorting") basadas en parámetros de fluorescencia. En el servicio funcionan dos citómetros analógicos de dos láseres y cuatro detectores de fluorescencia (FACScalibur), tres citómetros digitales, uno de ellos equipado con dos láseres y seis detectores de fluorescencia (FACSCanto A), los otros dos cuentan con tres láseres y ocho detectores de fluorescencia (FACSCanto II) uno de ellos además está dotado del sistema de adquisición en placa (High Throughput Sampler). El Servicio dispone también de dos separadores celulares, el modelo analógico FACSVantage dotado de tres láseres y seis detectores de fluorescencia y el nuevo FACS Aria Fusion dotado de 4 láseres y 16 detectores de fluorescencia. Éste último se encuentra integrado en una cabina de bioseguridad de Clase II. El análisis de los datos puede realizarse en tres equipos: un ordenador PowerMac G5 y un MacMini ambos equipados con licencias de los softwares FlowJo (versión 6.4.1 y 10.2 respectivamente) y un PC equipado con una licencia de FACSDiva (versión 8) y dos de FlowJo (versión 7.6.5 y 10.2).

Description

The flow cytometry facility provides instrumentation and technical assistance to carry out immunophenotypic analyses and cell functional studies based on flow cytometry techniques, as well as, cell-sorting strategies based on fluorescence parameters. The equipment available at the facility includes two analogical cytometers with two lasers and four fluorescence detectors (FACScalibur), three digital cytometers, one with two lasers and six fluorescence detectors (FACSCanto A), and two with three lasers and eight fluorescence detectors (FACSCanto II), one of them is equipped with a plate acquisition system (High throughput Sampler). Cytometry facility also has two cell sorters, one of them equipped with three lasers and six fluorescence detectors (FACSVantage SE) and the other (FACS Aria Fusion), which is integrated inside a Class II biosafety cabinet, is equipped with four lasers and sixteen fluorescence detectors. Data analysis can be carried out using computer equipment including a PowerMac G5 and a MacMini computer running "FlowJo" software (6.4.1 and 10.2 versions respectively), and a PC computer running "FACSDiva" (versión 8) and "FlowJo" (version 7.2.5 and 10.2).

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Mantenimiento y calibración de los equipos analíticos
2. Cursos de formación y manejo de los equipos de citometría analítica
3. Gestión del uso de los equipos, contabilidad y facturación
4. Mantenimiento y distribución de reactivos de citometría de flujo
5. Soporte en adquisición de muestras en FACScalibur y FACSCanto
6. Soporte en análisis de los resultados con diferentes softwares especializados
7. Separación de subpoblaciones celulares en FACSVantage y FACS Aria Fusion

SERVICES

1. Maintenance and calibration of analytic equipment
2. Training courses and supervision on analytical flow cytometry
3. Administrative duties
4. Maintenance of stocks and distribution of reagents for flow cytometry
5. Training in sample acquisition in FACScalibur and FACSCanto equipment
6. Training in analysis of results using specialized software
7. Separation of cell populations by cell sorting (FACSVantage and FACS Aria Fusion)

SERVICIO DE FERMENTACIÓN

FERMENTATION FACILITY

Director Técnico /
Technical Director:
Dionisio Ureña Rodríguez

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dr. José Berenguer Carlos

Personal / *Personnel:*
María Isabel Carrascal Blanco

Página Web / *Web page:*
<http://www.cbm.uam.es/fermentacion>



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 condiciones 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

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

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.

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

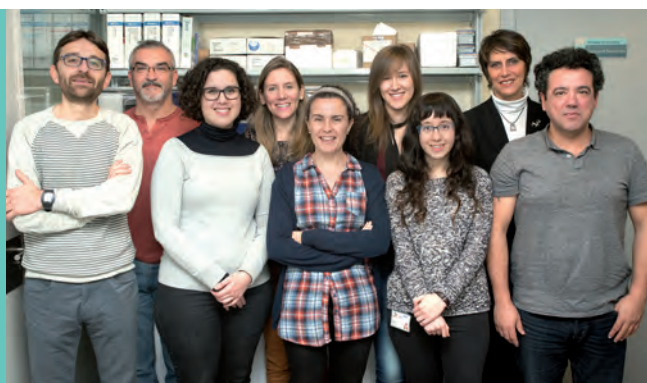
Ready-to-use *Escherichia coli* competent cells.

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

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
Dra. Begoña Aguado Orea

Coordinadora de la Sección de Genómica /
Genomics Section Coordinator
Dra. Laura Tabera Moreno

Coordinador de la Sección de NGS /
NGS Section Coordinator
Ramón Peiró Pastor

Personal / *Personnel:*
Sandra Gonzalo Flores
Manuel Belda Ávila
María José López Sánchez
(Desde diciembre de 2015)
Sandra González de la Fuente
(Desde diciembre de 2015)
Esther Camacho Cano
(Desde marzo hasta julio de 2016)

Página Web / *Web page:*
<http://www.cbm.uam.es/genomica>

Descripción

El Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva es responsable de la implementación y desarrollo de tecnologías de biología molecular, 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. Entre 2014 y 2016 coordinó la participación de varios investigadores en el MinION Access Program de Oxford Nanopore. Por último, el servicio organiza seminarios, congresos 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 Next-Generation Sequencing (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 until 2016 the facility coordinated the participation of several CBMSO researchers in the MinION Access Program of Oxford Nanopore. In addition, the facility organizes seminars, meetings and courses for users in its areas of specialization.

Publicaciones representativas con coautoría de personal del servicio o mención al mismo:

- Otero S, Desvoyes B, Peiró R, Gutiérrez C. (2016) Histone H3 Dynamics Reveal Domains with Distinct Proliferation Potential in the Arabidopsis Root. *Plant Cell*. 28:1361-71.
- Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón E, Reglero-Real N, Fernández-Martín L, Durán MC, Alonso MA, Correas I, Cox S, Ridley AJ, Millán J. (2016) RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol*. 213:385-402.
- Alonso G, Rastrojo A, López-Pérez S, Requena JM, Aguado B. (2016) Resequencing and assembly of seven complex loci to improve the Leishmania major (Friedlin strain) reference genome. *Parasit Vectors*. 9:74.
- Guantes R, Rastrojo A, Neves R, Lima A, Aguado B, Iborra FJ. (2015) Global variability in gene expression and alternative splicing is modulated by mitochondrial content. *Genome Res*. 25:633-44.
- Vila-Bedmar R, Cruces-Sande M, Lucas E, Willemen HL, Heijnen CJ, Kavelaars A, Mayor F Jr, Murga C. (2015) Reversal of diet-induced obesity and insulin resistance by inducible genetic ablation of GRK2. *Sci Signal*. 8(386):ra173.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Espectrofotometría: espectrofotómetros "Nanodrop" (3 equipos).
2. Extracción automática de ácidos nucleicos con el equipo "Maxwell16" (Promega).
3. Determinación de integridad de RNA en el equipo "Agilent bioanalyzer".
4. PCR convencional (a tiempo final) (3 equipos).
5. PCR y RT-PCR en tiempo real: robot de pipeteo Eppendorf epMotion 5075, equipos ABI 7900HT, Bio-Rad CFX384, y Roche Lightcycler 1.0 (3 equipos), software de análisis GenEx.
6. Secuenciación masiva (NGS): de novo, resecuenciación, RNA-seq, ChIP-seq, metagenómica, amplicones,...etc. Acceso a las plataformas Illumina, PacBio, Ion Torrent y MinION.
7. Análisis computacional de datos de NGS: alineamientos, ensamblajes, estudios de expresión diferencial, diversidad biológica, anotaciones de genomas, ...etc. (con software diseñado por el Servicio y paquetes de software como Bowtie, Velvet, SOAP, TopHat, Cufflinks, QIIME, ...etc.).
8. Análisis computacional (otras modalidades): de datos procedentes de experimentos de microarrays, análisis estadísticos, desarrollo de software a petición de usuarios, diseño de oligonucleótidos, etc. Uso del software Ingenuity Pathway Analysis (IPA).
9. Formación en técnicas computacionales y qPCR a usuarios internos y externos al CBMSO.

SERVICES

1. Spectrophotometry: "Nanodrop" spectrophotometers (3 instruments).
2. Automated nucleic acid extraction with the Promega "Maxwell16" instrument.
3. RNA integrity assessment with Agilent Bioanalyzer.
4. Conventional (end-point) PCR (3 instruments).
5. 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).
6. Next-Generation Sequencing (NGS): de novo, resequencing, RNA-seq, ChIP-seq, metagenomics, amplicons,...etc. Access to Illumina, PacBio Ion Torrent and MinION platforms.
7. NGS data computational analysis: alignments, assemblies, differential expression studies, biological diversity, genome annotation, ...etc, using "in-house" developed software as well as Bowtie, Velvet, SOAP, TopHat, Cufflinks, QIIME, ...etc.
8. Additional computational analysis: microarray data analysis with specialized packages, statistical analysis of experimental data, software development on demand, primer design. Use of Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software.
9. Training in computational techniques and qPCR for both internal and external researchers.

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
 Tamara Martín Pozas
 (Desde diciembre de 2015)

Página Web / *Web page:*
<http://www.cbm.uam.es/sme>



Descripción

El Servicio de Microscopía Electrónica (SME) proporciona apoyo científico-técnico a los grupos de investigación interesados en emplear la microscopía electrónica de transmisión para analizar complejos macromoleculares, virus, bacterias, células eucariotas y tejidos. Los métodos disponibles incluyen técnicas convencionales de procesamiento de muestras biológicas y criotécnicas 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 2015-2016, el SME ha realizado trabajos para más de 50 grupos de investigación, contribuyendo con su aportación a 26 publicaciones, entre las que destacamos:

Publicaciones / *Publications:*

Rodríguez-Fraticelli AE, Bagwell J, Bosch-Fortea M, Boncompain G, Reglero-Real N, García-León MJ, Andrés G, Toribio ML, Alonso MA, Millán J, Pérez F, Bagnat M, Martín-Belmonte F. (2015) Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nat Cell Biol.* 17:241-50.

Ventimiglia LN, Fernández-Martín L, Martínez-Alonso E, Antón OM, Guerra M, Martínez-Menárguez JA, Andrés G, Alonso MA. (2015) Cutting Edge: Regulation of Exosome Secretion by the Integral MAL Protein in T Cells. *J Immunol.* 195:810-4.

Hernández B, Guerra M, Salas ML, Andrés G. (2016) African Swine Fever Virus Undergoes Outer Envelope Disruption, Capsid Disassembly and Inner Envelope Fusion before Core Release from Multivesicular Endosomes. *PLoS Pathog.* 12:e1005595.

Bernabé-Rubio M, Andrés G, Casares-Arias J, Fernández-Barrera J, Rangel L, Reglero-Real N, Gershlick DC, Fernández JJ, Millán J, Correas I, Miguez DG, Alonso MA. (2016) Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 214:259-73.

Ávila-Pérez G, Rejas MT, Rodríguez D. (2016) Ultrastructural characterization of membranous torovirus replication factories. *Cell Microbiol.* 18:1691-1708.

Description

The electron microscopy (EM) facility provides scientific and technical support to research teams interested in using transmission EM to analyze macromolecular assemblies, viruses, bacteria, eukaryotic cells and tissues. Available methods for biological 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 equipment includes a 100 kV transmission electron microscope, 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 2015-2016 period, the EMF has been used by more than 50 research groups. Also, the EMF has contributed to 26 publications, participating as authors in the ones highlighted here.

SERVICES

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

- 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

(Hasta octubre 2016)

Ángeles Muñoz Alcalá

(Desde noviembre de 2016)

Supervisor Científico /

Scientific Supervisor:

Dr. Javier Díez Guerra

Personal / *Personnel:*

María Ángeles Muñoz Alcalá

Teresa Villalba Villacorta

Carmen Sánchez Jiménez

Alejandro Molina Moráis (Desde noviembre de 2016)

Alfonsa Díaz Torres (Desde diciembre de 2016)

Página Web / *Web page:*

<http://www.cbm.uam.es/confocal>

Descripción

El SMOC fue creado en el año 1999. Actualmente tenemos 6 sistemas confocales, 4 de ellos con adquisición espectral, un sistema Multifotón, 6 microscopios de campo ancho, una lupa y un vibratómetro. En 3 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 cultivo y reactivos con aplicaciones en microscopía óptica.

Estamos certificados en la norma ISO9001:2008 desde el 2009.

Description

The SMOC facility was created in 1999. Currently, we have six confocal systems, four of them with spectral acquisition, one Multiphoton system, six widefield microscopes, one stereomicroscope and one vibratome. Three 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.

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
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*
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:
 Dra. María Fernández Lobato

Personal / *Personnel:*
 Dr. Carlos García García
 Dra. Esperanza Morato López
 Nuria Sánchez López
 Laura Peláez Aguado

Página Web / *Web page:*
www.cbm.uam.es/servicios/proteomica.htm



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 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 es utilizado por numerosos proyectos de investigación en toda España.

Formación:

1. Cursos en Proteómica avanzada para el personal del Servicio.
 2. Seminarios dirigidos a usuarios acerca de los avances recientes en instrumentación
 3. Participación en congresos de Proteómica nacionales e internacionales
- Estancias: Dane Ruscuklu.- Izmir Institute of Technology (Turkey).
 Juan Daniel Cabrera.- IIS Hospital Universitario La Princesa (Madrid).
 Daniela Villamonte.- Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina).
 Martín Hugo.- Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (Alemania).

Publicaciones / Publications:

R. Alonso, D. Pisa, A. Marina, E. Morato, A. Rábano, I. Rodal, L. Carrasco. (2015) Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Biological Sciences*. 11:546-558

Andreu Z, Oshiro RO, Redruello A, López-Martín S, Gutiérrez-Vázquez C, Morato E, Marina AI, Gómez CO, Yáñez-Mó M. (2016) Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression. *Eur J Pharm Sci*. pii: S0928-0987(16)30431-6.

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 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

Guests: Dane Ruscuklu.- Izmir Institute of Technology (Turkey).
 Juan Daniel Cabrera.- IIS Hospital Universitario La Princesa (Madrid).
 Daniela Villamonte.- Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina).
 Martín Hugo.- Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (Alemania).

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)

Cuantificación relativa de diferencias en la abundancia de proteínas mediante métodos isobáricos (iTRAQ) y Label Free.

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)

Relative quantification of differences in protein abundance by isobaric methods (iTRAQ) and Label Free methods.

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)
ES cell technology (CBMSO)

Alfredo Serrano Montalbo
Microinyección (CNB)
Senior microinjectionist (CNB)

Marta García Flores
Biología Molecular (CNB)
Molecular Biology (CNB)

Alicia Llorente Herranz
Microinyección y gestión de colonias (CNB)
Microinjection and mouse colony management (CNB)

Página Web / *Web page:* <http://www.cbm.uam.es/transgenesidro>

Descripción

La unidad de transgénesis CNB-CBMSO es un servicio científico compartido por el CBMSO y CNB con el objetivo de dar apoyo a los grupos de investigación en la creación e intercambio de modelos murinos genéticamente modificados. La unidad proporciona todos los recursos necesarios tanto de animales como tecnología, incluyendo transgénesis aditiva, mutagénesis dirigida (KO y KI) o edición genética (ZFNs o CRISPR/Cas9). La unidad ofrece apoyo técnico y científico sobre la mejor estrategia para obtener modelos específicos de ratón específicos. Para ello contamos con 2 plataformas de microinyección, completamente equipadas, un laboratorio estándar de biología molecular y un laboratorio específico de células ES. El servicio tiene acceso pleno a los animalarios del CBMSO y CNB y está incluido en el Programa Sigma Aldrich de Unidades centralizadas para el análisis de nuevos productos relacionados con la tecnología CRISPR/Cas9.

Publicaciones / *Publications:*

Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(10):4855-4867.

Description

The Transgenesis Unit is a joint scientific service shared by CBMSO and CNB with the aim to provide support to researchers in the creation and interchange of genetically modified mouse models. We provide the necessary animal resources and technology either by additive transgenesis, targeted mutagenesis (KO, KI) or gene editing (ZFNs and CRISPR/Cas9). The Unit offers technical and scientific support on the best strategy to obtain specific mouse models in all the required steps: founder generation, breeding and management of lines in order to achieve the desired genotype. The service counts with two fully equipped microinjection settings, plus a standard molecular biology laboratory and a specific equipped laboratory for ES cells handling. The unit has access to the animal facilities of CBMSO and CNB. The service is included in the Sigma Aldrich CRISPR Core Partnership Program to test new CRISPR/Cas9 related products

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 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

Technical and scientific support in the design of target vectors or constructs for microinjection
Pronuclear microinjection of plasmidic BAC and YAC DNA
Vector electroporation into ES cell lines to generate KI models
Mouse genome editing using CRISPR/ Cas9 technology.
ES cells handling from targeted ES cell lines generated indoors or from international consortia 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 establishment and management of genetically altered mouse lines
Specific training in collection, handling and culture of mouse embryos in preimplantational stages

SERVICIO DE TRANSGÉNESIS DE *DROSOPHILA****DROSOPHILA* TRANSGENESIS FACILITY**

Directores Técnicos /
Technical Directors:
 Eva Caminero Jiménez
 Mar Casado García

Supervisor Científico /
Scientific Supervisor:
 Dra. Mar Ruiz Gómez

Personal / *Personnel:*
 Lorena Cobo Pino

Página Web / *Web page:*
<http://www.cbm.uam.es/transgenesisdro>

**Descripción**

El Servicio de Transgénesis de *Drosophila* se creó en el año 2014 con el objetivo de dar apoyo técnico a los grupos de investigación del CBMSO, CSIC y otros grupos externos nacionales e internacionales, mediante la generación de líneas de *Drosophila* genéticamente modificadas.

Cuenta con dos plataformas de microinyección, dotadas con microinyectores, microscopios estereoscópicos con fuente de luz fría y un estirador de micropipetas, así como de varias cámaras climatizadas para desecar los embriones a inyectar y para el mantenimiento de estirpes de *Drosophila*.

La actividad principal del servicio consiste en generar líneas transgénicas de *Drosophila* mediante transgénesis convencional o dirigida y la inyección de mezclas de DNA para edición genómica mediada por CRISPR/Cas9. Asimismo, el servicio mantiene una colección de 500 estirpes de *Drosophila* y una colección de plásmidos de cDNAs disponibles para cualquier grupo de investigación que lo solicite.

Description

The Drosophila Transgenesis Facility was established in 2014 to provide technical support to research teams at CBMSO, CSIC and other national and international groups, by generating genetically modified Drosophila strains.

It is equipped with two microinjection setups including microinjectors, stereomicroscopes with cold light source units and one micropipette puller as well as several incubators for desiccating embryos and for maintenance of Drosophila stocks.

The main activity of the transgenesis facility is to generate Drosophila transgenic lines and to inject cocktails for CRISPR/Cas genome editing. The facility also maintains a collection of over 500 Drosophila stocks and a Drosophila cDNA plasmid collection, available to researchers upon request.

PRESTACIONES DEL SERVICIO

1. Generación de cepas transgénicas por inserción aleatoria de DNA mediada por el transposón P en las cepas yw o w. El DNA "helper" lo proporciona el servicio, que también se encarga de preparar la mezcla de inyección
2. Inserción dirigida de transgenes mediada por la integrasa PhiC31 en las siguientes cepas receptoras: ZH-attP-22A, ZH-attP-51D, ZH-attP-68E y ZH-attP-86Fb
3. Inserción de vectores tipo BAC de la colección P(acman) mediada por la integrasa PhiC31
4. Inyección de mezclas de DNA para edición genómica con el sistema CRISPR/Cas9 en las siguientes cepas: 25C, 68A, Nos-cas9 y Vasa-cas9
5. Inyección de DNA en cepas específicas proporcionadas por el usuario
6. Envío de embriones inyectados o generación y envío de líneas transgénicas según el servicio solicitado.
7. Envío de estirpes de *Drosophila*
8. Plaqueo y entrega de plásmidos de la colección de cDNAs

SERVICES

1. *Generation of transgenic strains mediated by the transposon P (random insertion into yw or w strains). Helper DNA is provided by the facility, that also prepares the injection mixture*
2. *Targeted insertion of transgenes mediated by the PhiC31 integrase into the following acceptor strains: ZH-attP-22A, ZH-attP-51D, ZH-attP-68E, ZH-attP-86Fb*
3. *Transgenesis with BAC vectors [P(acman) collection]*
4. *Injection of DNA cocktails for gene editing using CRISPR/Cas technology in the strains: 25C, 68A, Nos-cas9 and Vasa-cas9*
5. *Insertion of DNA into specific strains provided by the customer*
6. *Shipment of injected embryos or generation and shipment of transgenic lines according to the requested service*
7. *Shipment of Drosophila stocks from the collection*
8. *Plating and shipment of cDNA plasmids*

16 Servicios Generales /
16 General Services

ADMINISTRACIÓN
ADMINISTRATION

BIBLIOTECA
LIBRARY

COMPRAS Y ALMACÉN
PURCHASE DEPARTMENT

CULTIVOS, LAVADO Y ESTERILIZACIÓN
*CELL CULTURE, WASHING AND
STERILIZATION*

DIRECCIÓN
MANAGEMENT BOARD

DISEÑO GRÁFICO. FOTOGRAFÍA
GRAPHIC DESIGN. PHOTOGRAPHY

GESTIÓN DE CALIDAD
QUALITY MANAGEMENT

GESTIÓN DE PERSONAL
PERSONNEL MANAGEMENT



Servicios Generales

General Services

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



● ADMINISTRACIÓN ADMINISTRATION

Jaime García Martín-Delgado
Carmen Arroyo Martín
Montserrat Barbero Maturana
Josefina Escribano Molina
Jessica Martínez Santos
Miguel Pérez Pulido
Sonia Rubio Lago
Belén Villar Pérez

● BIBLIOTECA LIBRARY

María Luisa Gorines López
Dunia Mairena Escribano

● COMPRAS Y ALMACÉN PURCHASE DEPARTMENT

M^a Carmen Rico Ruiz
José Miguel Celestén Martín
M^a José Fernández Martín
Jesús Miguel Hernández Lago
Ana María Ocaña Mateos
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
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

● DIRECCIÓN MANAGEMENT BOARD

Antonia Condes Cano

● DISEÑO GRÁFICO FOTOGRAFÍA GRAPHIC DESIGN PHOTOGRAPHY

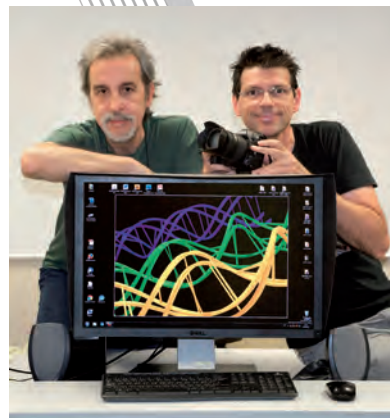
José Ignacio Belio López
José Antonio Pérez Gracia

● GESTIÓN DE CALIDAD QUALITY MANAGEMENT

Amalia Ameiros López

● GESTIÓN DE PERSONAL PERSONNEL MANAGEMENT

M^a Reyes Llaguno Pérez
Remedios Madrid del Álamo
Isabel de la Rosa Santos
Pedro Alejandro Pérez García



● GERENCIA MANAGEMENT

Germán Lerma Rodrigo
Pilar Nogal París

● INFORMÁTICA COMPUTING

Pedro Pemau Alonso
Luis Antón Pérez
Diego Díaz Rodilla
Ángel J. Gonzalo Gonzalo
María Peña Pérez García

● INSTRUMENTACIÓN INSTRUMENTS AND EQUIPMENT

Francisco Gutiérrez de la Cruz
Juan A. Delgado Rodríguez
Jesús González Galán
José Luis Mejías Pozuelo
Fernando Muñoz Maqueda

● MANTENIMIENTO MAINTENANCE

José Antonio Muñoz Díez
José Andrés Hernández
Pedro Pablo Cordon Polanco
Juan Luis García Alarcón
César Martos Valladares
José María Sanz Mejías

● RECEPCIÓN RECEPTION

M^a Jesús Gil Marinas

● RELACIONES INSTITUCIONALES INSTITUTIONAL RELATIONS

Almudena Hernando

● 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



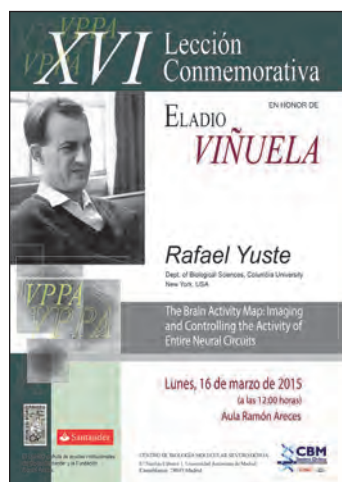
SEMINARIOS / SEMINARS

- 196 Lecciones Conmemorativas / Memorial Lectures**
- 197 Seminarios Severo Ochoa / Severo Ochoa Seminars**
- 198 Seminarios Special / Special Seminars**
- 200 Seminarios Ciclo Avances en Biomedicina / Advances in Biomedicine Seminar Cycle**
- 201 Seminarios Interdepartamentales / Interdepartmental Seminars**
- 201 Tesis Doctorales / Doctoral Theses**

Seminarios y Lecciones

Seminars and Lectures



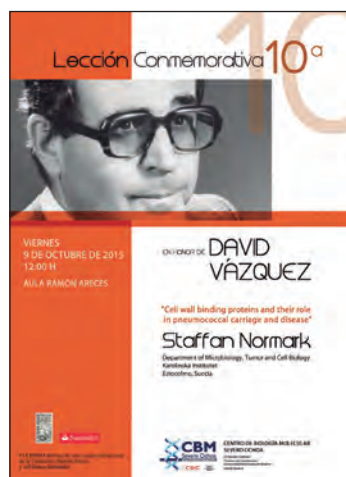


XVI Lección Conmemorativa Eladio Viñuela 2015
XVI Eladio Viñuela Memorial Lecture 2015

Rafael Yuste 16/03/2015

Dept. of Biological Sciences, Columbia University
New York, USA

"The Brain Activity Map: Imaging and Controlling the Activity of Entire Neural Circuits"



X Lección Conmemorativa David Vázquez 2015
X David Vázquez Memorial Lecture 2015

Staffan Normark 9/10/2015

Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia

"Cell wall binding proteins and their role in pneumococcal carriage and disease"



XVII Lección Conmemorativa Eladio Viñuela 2016
XVII Eladio Viñuela Memorial Lecture 2016

Manuel Serrano 16/03/2016

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CNIO, Madrid

"An integrated perspective of cellular senescence and cellular reprogramming"

XI Lección Conmemorativa David Vázquez 2016
XI David Vázquez Memorial Lecture 2016

Fernando Baquero 10/10/2016

Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

"Resistance to antibiotics as a model system in evolutionary biology"

XXII Lección Conmemorativa Severo Ochoa 2015
XXII Severo Ochoa Memorial Lecture 2015

Didier Stanier 20/11/2015

Max Planck Institute for Heart and Lung Research
Bad Nauheim, Alemania

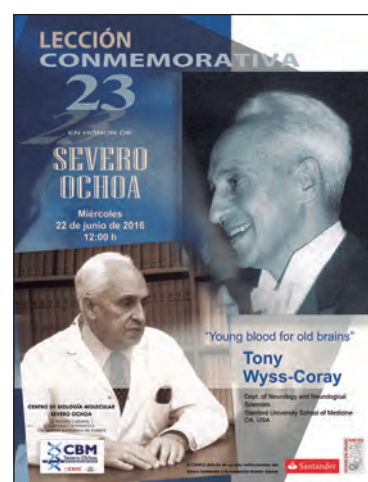
"Imaging heart formation and function in zebrafish"

XXIII Lección Conmemorativa Severo Ochoa 2016
XXIII Severo Ochoa Memorial Lecture 2016

Tony Wyss-Coray 22/06/2016

Dept. of Neurology and Neurological Sciences
Stanford University School of Medicine, CA, USA

"Young blood for old brains"





16º y 17º Ciclo Seminarios Severo Ochoa “Avances en Biología Molecular” 2015/2016

*16º and 17º Severo Ochoa Cycle
“Advances in Molecular Biology” 2015/2016*

2015	FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
	21/01/2015	MARK M. DAVIS	Stanford University School of Medicine	Immunology Taught By Humans
	06/02/2015	ANDRÉS AGUILERA	CABIMER, Sevilla	RNA-DNA hybrids as modulators of chromatin structure and genome dynamics
	06/03/2015	DANIEL ST JOHNSTON	The Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK	The role of mitotic spindle orientation in maintaining epithelial monolayers
	13/03/2015	STEFAN OFFERMANN	Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany	Metabolite GPCRs – regulation of adipocyte, immune and beta-cell function
	10/04/2015	OLIVIER SCHWARTZ	Instituto Pasteur, Francia	HIV cell-to-cell spread, innate and adaptive countermeasures
	24/04/2015	JÜRG BÄHLER	University College London, United Kingdom	Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes
	08/05/2015	MAREB KOKAIA	Epilepsy Center, Department of Clinical Sciences, Lund University Hospital, Sweden	Optogenetics at work: Novel treatment strategies for Epilepsy
	22/05/2015	TON SCHUMACHER	Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands	What T cells see on human cancer
	14/07/2015	RICHARD ROBITAILLE	Department of Neuroscience, University of Montreal, Canada	Roles of Glial Cells in the Formation and Dysfunction of the Neuromuscular Synapse
	04/12/2015	LUIS ARAGÓN ALCAIDE	MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College London, UK.	SMC complexes and their roles coordinating DNA repair and chromosome segregation
	11/12/2015	RICHARD MORRIS	The University of Edinburgh, Scotland, U.K.	The making, keeping and losing the memory
2016	12/02/2016	ADOLFO GARCÍA SASTRE	Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L, Levy Place. New York	Influenza virus-host interactions
	11/03/2016	AKHILESH REDDY	Wellcome Trust Senior Fellow in Clinical Sciences, University of Cambridge, U.K.	Redox oscillations in the circadian (24 hour) clockwork
	22/04/2016	MARINO ZERIAL	Max Plank Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany	Biogenesis and computational functions of the endosomal network
	06/05/2016	HILMAR BADING	Department of Neurobiology IZN, University of Heidelberg, Germany	The Synapse-to-nucleus communication axis: mechanisms, function and deregulation in neurodegeneration
	10/06/2016	WENDY BICKMORE	MRC Human Genetics Unit MRC IGMM, University of Edinburgh	The remote control of gene expression: mechanisms of enhancer function
	01/07/2016	FIONA M. WATT	King's College London. 28th Floor, Tower Wing. Guy's Hospital, London, UK.	Regulation of epidermal stem cell fate
	18/10/2016	CLAUDE DESPLAN	Department of Biology, New York University, US	Generating neural diversity in the visual system
	10/11/2016	FRANCISCO MARTÍNEZ MOJICA	Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante	Origin and applications of the CRISPR technology
	13/12/2016	MARTIN CHALFIE	Columbia University, Biological Sciences, New York, USA	GFP: Lighting Up Life



Seminarios Special 2015-2016

Special Seminars 2015-2016

FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
13/01/2015	ANTONIO GARCÍA-BELLIDO	Profesor Ad Honorem del CSIC en el CBMSO	Mis exploraciones científicas
20/02/2015	DAVID PRANGISHVILI	Institut Pasteur, Paris, France	The Wonderful World of Archaeal Viruses
26/02/2015	CARLOS FERNÁNDEZ-HERNANDO	Yale University School of Medicine, USA	Regulation of cardiometabolic diseases by microRNAs
06/04/2015	MIQUEL BOSCH	Bosch The Picower Institute for Learning and Memory, Massachusetts Institute of Technology	The molecular mechanisms of memory persistence: remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation
14/04/2015	JUAN MODELELL	Profesor Ad Honorem del CSIC en el CBMSO	De la Bioquímica a la Biología del Desarrollo, pasando por la Microbiología
04/05/2015	ARP SCHNITTGER	Department of Developmental Biology, University of Hamburg, Germany	Control of the homologous DNA repair pathway in plants
06/05/2015	OLGA PEÑAGARIKANO	UCLA y Universidad del País Vasco/EHU	Autism Spectrum Disorders: from human genetics to mouse models and therapeutics
18/05/2015	L. FELIPE BARROS	Centro de Estudios Científicos CECs, Valdivia, Chile	Neurometabolic coupling mechanisms revealed with novel FRET nanosensors
29/05/2015	WILLIAM YANG	UCLA	Mouse Genetic Dissection of Huntington's Disease Pathogenesis <i>in vivo</i>
02/06/2015	A. LOSADA, G. H. KARPEN, A. DERNBURG, C. GONZÁLEZ	ORGANIZADO POR María Méndez-Lago and Isabel Guerrero (CBMSO)	Evolution of Centromeres and Telomeres (Tribute to Alfredo Villasante)
09/06/2015	A. CLAUDIO CUELLO	Department of Pharmacology, McGill University Montreal, PQ, Canada	Evidence for an early-proinflammatory process and deregulation of the NGF metabolism in the Alzheimer's pathology
18/06/2015	RAFAEL RADI	Univ.de la República. Fac. de Medicina. Departamento de Bioquímica, Montevideo, Uruguay	Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in pathology: opportunities for mitochondrial-targeted pharmacology <i>in vivo</i>
22/06/2015	CHRIS Q. DOE	HHMI, Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene (USA)	Temporal patterning generates neuronal diversity in <i>Drosophila</i>
08/07/2015	MALKA N. HALGAMUGE	Department of Electrical and Electronic Engineering, University of Melbourne, Australia	Raising Public Awareness of Radiation: Potential Health Risks from Non-ionizing Radiation Hazards
09/07/2015	PATRICIA HORCAJADA	Institut Lavoisier, CNRS, Université de Versailles, Francia	Metal Organic frameworks for bioapplications
20/07/2015	ALFREDO GIMÉNEZ-CASSINA	Karolinska Institut, Stockholm, Suecia	New mechanisms of nutrient sensing and metabolic homeostasis
16/09/2015	PEDRO FERNÁNDEZ FÚNEZ	University of Florida College of Medicine. Gainesville, Florida, USA	Strategies to suppress Amyloid-beta toxicity in <i>Drosophila</i>
18/09/2015	MATTHEW GENTRY	University of Kentucky Lexington, USA	Glucan phosphatases link neurodegeneration of plant starch metabolism
09/10/2015	CHRISTOPHER M. GÓMEZ	Department of Neurology. The University of Chicago, Chicago IL, USA	Biscistronic Cellular Genes: Insights for Therapy and for Complex Phenotypes
14/10/2015	KEN MCCULLOUGH	Institute of Virology and Immunology in collaboration with the University of Bern, Switzerland	Synthetic vaccine delivery to dendritic cells
03/11/2015	JOHAN GARAUDE	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.	Mitochondrial respiratory chain adaptations in the innate immune system
25/11/2015	ANAND SWAROOP	National Eye Institute, National Institutes of Health Bethesda, Maryland, USA	Stem cell-based therapies for retinal neurodegeneration



Seminarios Special 2015-2016

Special Seminars 2015-2016

FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
04/01/2016	DIANA GIL PAGÉS	Mayo Clinic Department of Immunology, USA	Exploiting conformational changes found in antigen receptors to manipulate T cell function
19/01/2016	DIEGO VILLAR	Cambridge Institute - Cancer Research UK and University of Cambridge, UK	Evolution of gene regulation in 20 mammals
21/01/2016	MARÍA MITTELBRUNN	Fundación de Investigación del Hospital 12 de Octubre	Comunicación mitocondria-sistema endolisosomal durante la inflamación
05/02/2016	VICTOR TYBULEWICZ	Francis Crick Institute . Imperial College London, London, UK	Novel signalling pathways controlling T cell adhesion and migration
17/02/2016	JORDI GÓMEZ CASTILLA	Instituto de Parasitología López-Neyra	Arqueología de RNA
26/02/2016	JOSÉ MARÍA FERNÁNDEZ SOUSA	Presidente de PharmaMar	Discovery and Development of marine-derived anti-cancer agents
02/03/2016	DAVID G. MÍNGUEZ	Biophysics and Systems Biology Lab., Dpto. de Física de la Materia Condensada, UAM	Systems approaches to cancer and developmental systems
20/05/2016	ROLF KARLSTROM	Department of Biology, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA	Life-Long Roles for Shh in the Zebrafish Forebrain and Pituitary: Tracking Hedgehog Signaling from Cradle to Gravel
24/05/2016	ALESSANDRA AGRESTI	Chromatin Dynamic Unit, San Raffaele Scientific Institute .Milano, Italy	Living with fewer histones: Nucleosome number modulation as a new layer of epigenetic regulation
27/05/2016	CASSANDRA EXTAVOUR	Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA	Alternative model organisms: new tools, new insights into the evolution of development
07/06/2016	THOMAS KORBERG	Department of Biochemistry and Biophysics ,UCSF, San Francisco, CA. USA	Mechanisms that sculpt positional information in and between cells
07/07/2016	MARÍA JESÚS GARCÍA-GARCÍA	Molecular Biology and Genetics Dept. Cornell University, USA	A forward genetics journey from embryonic morphogenesis to genomic imprinting ... and back
19/07/2016	RON GELLER	(Evolution and Health Group, Universidad de Valencia)	Mutation processes in HIV/HCV and the chaperoning of RNA viruses
07/09/2016	ELVA DÍAZ	Department of Pharmacology, University of California Davis, USA	Regulation of synapse development and plasticity by neurotransmitter receptor interacting proteins
14/09/2016	MICHAEL DUCHEN	College of London	Explorations of cellular bioenergetics and mitochondrial calcium signaling in health and disease
26/09/2016	JOSÉ FARALDO-GÓMEZ	Theoretical Molecular Biophysics Section, National Institutes of Health MD USA	Rationalizing strict coupling in ion-driven membrane transport through free-energy landscapes
30/09/2016	ANGELA GIANGRANDE	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire-IGBMC, INSERM, Strasbourg, Francia	Of gliogenesis and hematopoiesis
10/10/2016	RAFAEL CANTERA	Universidad de Estocolmo (Suecia) / Inst. de Inv. Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay	Intracerebral segregation of air tubes cause localized hypoxia and is necessary for normal brain development in <i>Drosophila</i>
02/12/2016	JOSÉ LUIS DE LA POMPA	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Instituto de Salud Carlos III(ISCIII)	Developmental mechanisms in mouse cardiac chamber formation: Implications in disease"



Seminarios de Ciclo Avances en Biomedicina 2015-2016

Advances in Biomedicine Seminar Cycle 2015-2016

2015

FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
19/01/2015	PATRICK LEMAIRE	Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM), Montpellier, France	Developmental systems divergence in ascidians: when regulatory mechanisms evolve faster than the traits they control
23/02/2015	MARCO MILÁN	Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)	Nutrition, growth and survival: a fly view
02/03/2015	EDUARDO EYRAS	Universitat Pompeu Fabra, Barcelona	Dissecting cancer-specific splicing regulatory programs
04/03/2015	CLARE BLACKBURN	MRC Centre for Regenerative Medicine, Edinburgh, UK	Building and rebuilding the thymus - can FOXN1 do it all?
11/05/2015	OSCAR LLORCA	Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Madrid	Understanding DNA repair and RNA degradation in 3D by Electron Microscopy
01/06/2015	JOSÉ R. PENADÉS	College of Medical, Veterinary and Life Sciences University of Glasgow	La interminable guerra entre fagos y fagos satélites dirige la evolución y virulencia bacteriana
24/06/2015	MARCUS SMOLKA	Weill Institute for Cell and Molecular Biology, Cornell University Ithaca, New York, USA	Genome Integrity: Rethinking Checkpoints
23/10/2015	VICTORIA SANZ MORENO	Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, New Hunt's House. King's College London	Using multidisciplinary approaches to study the role of cytoskeletal dynamics in cancer progression
06/11/2015	RUI COSTA	Champalimaud Center, Lisboa. Portugal	Generating and Shaping Novel Action Repertoires in the Brain
30/11/2015	FÉLIX REY	Department of Virology, Institut Pasteur (CNRS), Paris, Francia	A quaternary epitope on the dengue virus envelope protein can be used for the design of an efficient vaccine

2016

18/01/2016	PHILLIPE BOUSSO	Institut Pasteur. Paris, Francia	Decoding immune responses to infection and cancer using intravital imaging
09/02/2016	FLORIAN HOLLFELDER	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK	Rules and Tools for Efficient Enzyme Evolution, Recruitment and Discovery
22/02/2016	DARREN GILMOUR	Cell Biology and Biophysics, EMBL Heidelberg, Germany.	The Collective Cell Biology of Organ Formation
29/02/2016	MAITE HUARTE	Dept. Of Oncology, Centro de Investigación Médica Aplicada -CIMA-, Pamplona, Navarra	The p53 response reveals tumor suppressor and oncogenic lncRNAs
07/03/2016	NURIA VERDAGUER	Institut de Biologia Molecular de Barcelona. (IBMB). Barcelona	Maquinarias replicativas de virus RNA: de la estructura y mecanismo molecular al diseño de antivirales
04/04/2016	MICHAEL BRAND	Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics (MPI-CBG). Germany	Regeneration of new neurons in the adult zebrafish brain: extending Cajal ?
29/04/2016	ISABEL PÉREZ OTAÑO	Dept. Neurobiología Celular. Centro de Investigación Médica Aplicada -CIMA-. Pamplona, Navarra	Roles of non-conventional NMDA receptors in the refinement of neural circuits
03/06/2016	DANA BRANZEI	IFOM-IEO Campus, Milán, Italia	DNA replication and recombination: tight connections
08/09/2016	TOMOHIRO KUROSAKI	Riken Center for integrative Medical Sciences, Kanagawa, Japón	Memory B cell generation mechanisms
23/09/2016	PATRICIA SALINAS	Research Department of Cell and Developmental Biology. UCL. London, UK	Restoring synapse connectivity by activation of Wnt signalling: implication in Alzheimer's disease
03/10/2016	MARK DELL'ACQUA	Department of Pharmacology. University of Colorado, Denver, USA	Regulation of Synaptic Plasticity by Anchored Kinase and Phosphatase Signaling
05/10/2016	MANUEL IRIMIA	Centre for Genomic Regulation. Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona, Spain	A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains
28/10/2016	RONALD MARQUET	French National Centre for Scientific Research, Paris, France	Mutational Interference Mapping Experiments: a new tool to study the interactions between nucleic acids and their partners <i>in vitro</i> and in cells



Seminarios Interdepartamentales 2015-2016

Interdepartmental Seminars 2015-2016

2016	FECHA / DATE	SEMINARISTA / SPEAKER	CENTRO / CENTER	TÍTULO DEL SEMINARIO / TITLE OF SEMINAR
	08/04/2016	JOSÉ F. DE CELIS	Departamento de Desarrollo y Regeneración	Aproximaciones experimentales al análisis del desarrollo y la diferenciación celular
	13/10/2016	CARLOS DOTTI	Departamento de Neuropatología Molecular	Open projects in the Dotti lab in search of collaborators



Tesis Doctorales 2015-2016

Doctoral Theses 2015-2016

2015	DOCTORANDO / DOCTORAL STUDENT	DPTO / DEPT	TÍTULO / TITLE	DIRECTOR / DIRECTOR
	ALEJANDRO SANZ BRAVO	Biología Celular e Inmunología	Mecanismo molecular implicado en la configuración del peptidoma de HLA-B*27 por variantes naturales de ERAP1 asociadas a la espondilitis anquilosante	José A. López de Castro
	ANA M ^a RONCERO SÁNCHEZ	Biología Celular e Inmunología	Implicación de JAK2 en el desarrollo de los linfomas linfoblasticos de células T	José F. Piqueras y Pilar López Nieva
	CARLOS ÁLVAREZ NAVARRO	Biología Celular e Inmunología	El peptidoma en enfermedades asociadas a antígenos de MHC-I. Mimetismo molecular entre ligandos de HLA-B*27 en artritis reactiva e interacción funcional de ERAP1 y HLA-A*29 en la retinopatía en peridionada	José A. López de Castro
	ELIA LÓPEZ-BERNARDO	Biología Celular e Inmunología	Regulation of the expression and function of mitochondrial uncoupling protein UCP3 in response to oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2 and implications in cardiac ischemia-reperfusion	Susana Cadenas
	ESPINOSA DIEZ, M ^a CRISTINA	Biología Celular e Inmunología	Papel de la gamma-glutamyl cystein ligase en modelos de daño vascular y fibrótico e implicación de miR-433 en la síntesis de glutatión	Santiago Lamas
	GARCÍA ORTÍZ, ALMUDENA	Biología Celular e Inmunología	Papel de eNOS en la regulación de PKC-θ en la sinapsis inmune de los linfocitos T	Juan M. Serrador
	JAVIER GARCÍA BERMÚDEZ	Biología Celular e Inmunología	Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor fisiológico de la H ⁺ -ATP sintasa de la mitocondria.	José M. Cuezva y María Sánchez Aragón
	LIAPPAS, GEORGIOS	Biología Celular e Inmunología	Early leukocyte activation receptor CD69: a novel player in the maintenance of the TH17/Treg balance peritoneal fibrosis	Manuel López Cabrera
	LUCAS FERNÁNDEZ, ELISA	Biología Celular e Inmunología	GRK2 in the cardiovascular disease continuum: Role in hypertension and insulin resistance	Federico Mayor y Cristina Murga



Tesis Doctorales 2015-2016

Doctoral Theses 2015-2016

2015	DOCTORANDO / DOCTORAL STUDENT	DPTO / DEPT	TÍTULO / TITLE	DIRECTOR / DIRECTOR
	MARCOS RAMIRO, BEATRIZ	Biología Celular e Inmunología	La GTPasa endosomal RhoB regula la recuperación de la barrera endotelial durante la inflamación	Jaime Millán
	MENDOZA DAROCA, PILAR	Biología Celular e Inmunología	La GTPasa RRas2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal	Balbino Alarcón
	MOSQUERA SÁIZ, MARTA	Biología Celular e Inmunología	Estudio de la contribución de la vía de Notch1 y sus efectores moleculares a la patogénesis de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL)	M ^a Luisa Toribio García
	NIETO PINTADO, RAQUEL	Biología Celular e Inmunología	Estudio de las acciones de prostaglandinas ciclopentenonas sobre la activación de linfocitos T	Miguel Angel Íñiguez
	PASCUAL GARCÍA, ALBERTO	Biología Celular e Inmunología	Emergent patterns in protein, microbial and mutualistic systems	Ugo Bastolla
	VICENTE RUIZ CARPIO	Biología Celular e Inmunología	Análisis de la huella genética de la transición mesotelio mesenquimal: Caracterización de nuevos marcadores en dialysis peritoneal.	M.López Cabrera/A.o Aguilera Peralta
	BALLESTEROS ARIAS, LUNA LAURA	Desarrollo y Regeneración	The role of cell competition in tumour initiation and progression in <i>Drosophila melanogaster</i>	Ginés Morata
	DURÁN TRÍO, LARA AMAYA	Desarrollo y Regeneración	Brain alterations in Lafora disease mouse models	Santiago R. de Córdoba y Paola Bovolenta
	FERNÁNDEZ HEVIA, COVADONGA	Desarrollo y Regeneración	Función de la ruta de señalización TGFβ/Activina en el control del crecimiento durante el desarrollo en <i>Drosophila melanogaster</i>	José F. de Celis
	MARTÍN MONTERO, MARÍA	Desarrollo y Regeneración	La apoptosis como factor promotor de tumorigénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	Ginés Morata
	NIETO LÓPEZ, FRANCISCO JAVIER	Desarrollo y Regeneración	Papel de Boc y Sfrp1/2 en la especificación y guía de los axones de las células ganglionares de la retina	Paola Bovolenta
	RODRIGUEZ CURT, JESÚS	Desarrollo y Regeneración	Análisis funcional de la proteína Abdominal-B y de los genes extradenticle y homothorax en <i>Drosophila melanogaster</i>	Ernesto Sánchez-Herrero
	HOLGUERA LÓPEZ, M ^a ISABEL	Dinámica y Función del Genoma	Estudio del dominio de unión a DNA de la proteína terminal del bacteriófago f29 y sus papel en la replicación del DNA viral.	Margarita Salas y Daniel Muñoz Espín
	MANUEL GARCIA MORENO	Dinámica y Función del Genoma	Mecanismos de iniciación de la traducción de los mRNAs del virus Sindbis	Luis Carrasco y Miguel Angel Sanz
	MARIANA COSTA DUARTE	Dinámica y Función del Genoma	Identificação de antígenos de <i>Leishmania Viania braziliensis</i> por meio de uma ferramenta imunoproteomica para emprego no diagnostico sorologico da Leishmaniose Tegumentar Humana.	Eduardo A.F. Coelho y Manuel Soto



Tesis Doctorales 2015-2016

Doctoral Theses 2015-2016

2015	DOCTORANDO / DOCTORAL STUDENT	DPTO / DEPT	TÍTULO / TITLE	DIRECTOR / DIRECTOR
	SOFÍA OTERO PÉREZ	Dinámica y Función del Genoma	Funciones de las histonas H3.1 y H3.3 durante el desarrollo de Arabidopsis	Crisanto Gutiérrez
	ESCOLL GUERRERO, M ^a ISABEL	Neuropatología Molecular	WIP media la función oncogénica de p53 mutante	Francisco Wandosell y Ricardo Gargini
	FERNÁNDEZ NOGALES, MARTA	Neuropatología Molecular	Papel de GSK-3 y TAU en la Enfermedad de Huntington	José J. Lucas
	LORENA GALLEGU VILLAR	Neuropatología Molecular	Estudios genéticos, fisiopatológicos y con oligonucleótidos antisentido en enfermedades neurometabólicas	Lourdes Ruiz Desviat, Eva Richard
	MORENO LORITE, JARA	Neuropatología Molecular	Alteraciones en el transcriptoma y las vías de reparación del DNA en modelos celulares neurales de ataxia de Friedreich	Javier Díaz Nido y Sara Pérez Luz
	PALLAS BAZARRA, NOEMÍ	Neuropatología Molecular	Estudio del papel de la proteína tau en la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta	María Llorens, Félix Hernández y Juan José Garrido
	PATRICIA YUSTE CHECA	Neuropatología Molecular	Desarrollo de terapias específicas de mutación en enfermedades metabólicas hereditarias	Belén Pérez
	PÉREZ CAÑAMÁS, AZUCENA	Neuropatología Molecular	Alteraciones de la homeostasis de calcio estrés oxidativo en neuronas deficientes en la esfingomielinasa ácida. Implicación en la enfermedad de Niemann Pick tipo A.	Dolores Ledesma
	AGUILERA ROSSI, CRISTINA GUSTAVO	Virología y Microbiología	Caracterización funcional y estructural de LMM-PBP4 y análisis de su papel modulador en la integridad molecular del peptidoglicano para el modelo bacteriano Pseudomonas aeruginosa.	Juan A. Ayala
	HEIDARIEH SOROSH, HALEH	Virología y Microbiología	Caracterización molecular y funcional de la proteína de unión a quimioquinas E163 de ECTV.	Antonio Alcamí
	QUINTAS GOROZARRI, ANA	Virología y Microbiología	African Swine Fever Virus-mediated regulation of RNA metabolism: g5Rp, a putative viral decapping enzyme	Yolanda Revilla
	SAN MARTÍN URIZ, PATXI	Virología y Microbiología	Isolation and characterization of Acidiphilium sp. PM, a nickel-resistant electricigen from Río Tinto	Ricardo Amils
	VIEIRA PRADO, YURI ALLENDE	Virología y Microbiología	Contribuciones al estudio de la funcionalidad de proteínas no estructurales del virus de la fiebre aftosa.	Francisco Sobrino y María Flora Rosas



Tesis Doctorales 2015-2016

Doctoral Theses 2015-2016

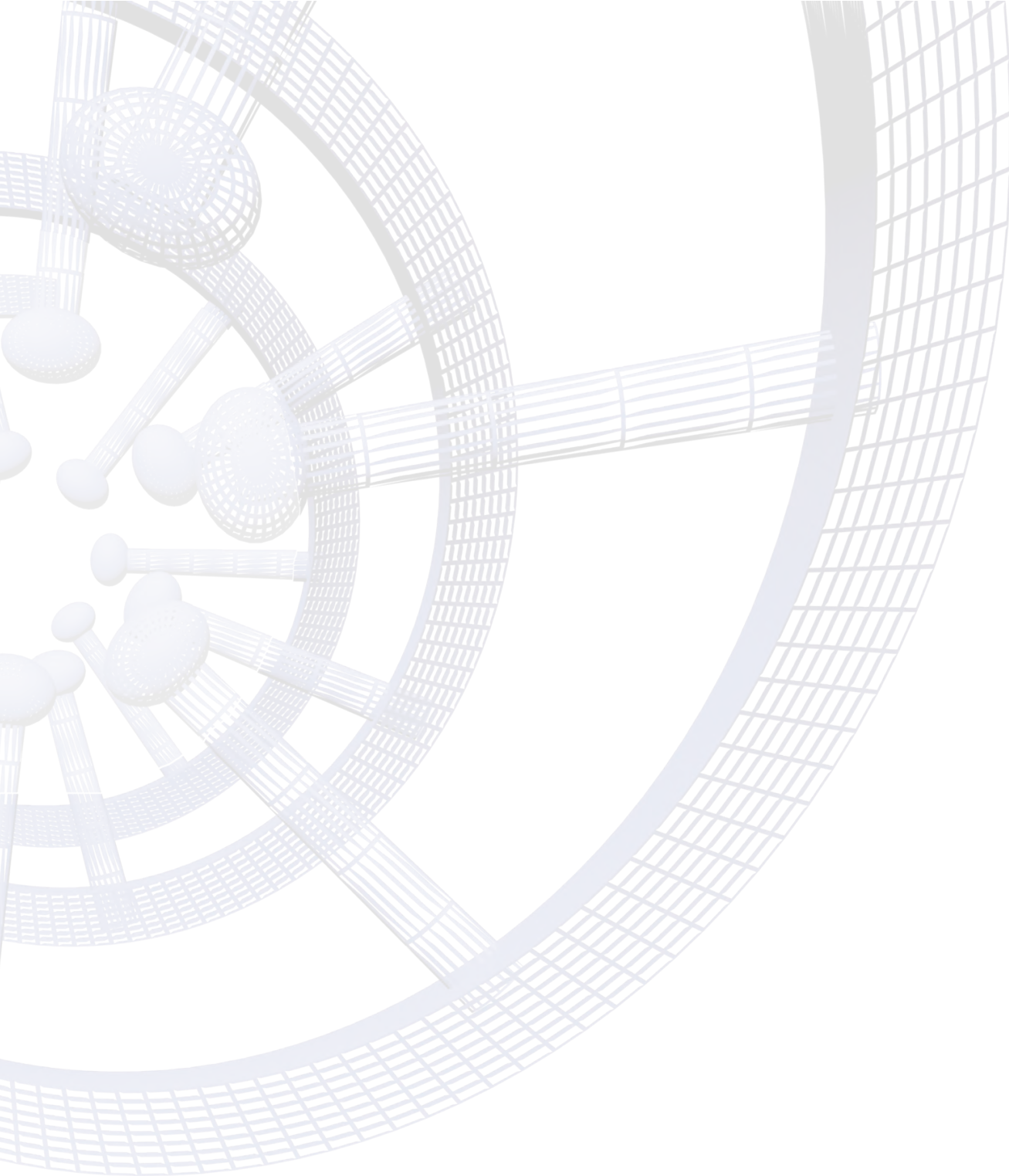
2016	DOCTORANDO / DOCTORAL STUDENT	DEPTO / DEPT	TÍTULO / TITLE	DIRECTOR / DIRECTOR
	MARÍA RONCALES POZA	Biología Celular e Inmunología	Cultivo y ensayos <i>in vitro</i> de las formas eritrocíticas del parásito productor de la malaria (<i>Plasmodium falciparum</i>). Caracterización de nuevos derivados químicos con actividad antimalárica: 4(1H)-piridonas	Esperanza Herreros y Pedro Bonay
	M ^o JESÚS GARCÍA LEÓN	Biología Celular e Inmunología	Expression and functional analysis of the Notch signaling pathway within the thymus microenvironment	María Luisa Toribio
	RAQUEL REYES MANZANAS	Biología Celular e Inmunología	La tetraspanina CD9 regula la capacidad adhesiva de la integral leucocitaria LFA-1	Carlos Cabañas
	PABLO MORAL LÓPEZ	Dinámica y Función del Genoma	Regulación de la traducción de mRNAasas virales y celulares. Efectos de proteasas virales	Luis Carrasco Llamas
	ALMUDENA GARCÍA ORTIZ	Biología Celular e Inmunología	Papel de eNOS en la regulación de PKC- θ en la sinapsis inmune de los linfocitos T	Juan M. Serrador
	PILAR MENDOZA DAROCA	Biología Celular e Inmunología	La GTPasa Rras2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal	Balbino Alarcón
	LUNA LAURA BALLESTEROS ARIAS	Desarrollo y Diferenciación	The role of cell competition in tumour initiation and progression in <i>Drosophila melanogaster</i>	Ginés Morata
	INMACULADA CRESPO GALÁN	Desarrollo y Diferenciación	Función de Sfrp1 (Secreted Frizzled Related Protein 1) durante el desarrollo de la corteza cerebral y estudio de su posible implicación en la Enfermedad de Alzheimer	Paola Bovolenta y Pilar Esteve
	MARÍA RONCALES POZA	Biología Celular e Inmunología	Cultivo y ensayos <i>in vitro</i> de las formas eritrocíticas del parásito productor de la malaria (<i>Plasmodium falciparum</i>). Caracterización de nuevos derivados químicos con actividad antimalárica: 4(1H)-piridonas	Esperanza Herreros y Pedro Bonay
	ERNEST PALOMER VILA	Neurobiología Molecular	Epigenetic mechanisms involved in neuronal BDNF gene expression in adult and aged mouse in response to cognitive stimulation	Carlos Dotti
	ALBA BLESÁ ESTEBAN	Virología y Microbiología	Horizontal Gene Transfer in <i>Thermus thermophilus</i> : mechanisms and barriers	José Berenguer
	ANGELA RYNNE VIDAL	Biología Celular e Inmunología	The mesothelial origin of carcinoma-associated fibroblasts in peritoneal metastasis. The mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target	Manuel López Cabrera y Pilar Sandoval
	MERCEDES MARTÍN FERNÁNDEZ	Desarrollo y Diferenciación	Análisis de los genes y mecanismos que median las funciones de las proteínas Spalt en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	José F. de Celis



Tesis Doctorales 2015-2016

Doctoral Theses 2015-2016

2016	DOCTORANDO / DOCTORAL STUDENT	DEPTO / DEPT	TÍTULO / TITLE	DIRECTOR / DIRECTOR
	IGNACIO IBÁÑEZ SAINZ-PARDO	Neurobiología Molecular	Estudio de la regulación dependiente de actividad del tráfico intracelular del transportador de glutamato GLT-1	Francisco Zafra y Cecilio Giménez
	ALFONSO OYARZÁBAL SANZ	Neurobiología Molecular	Del gen a la patofisiología: nuevas enfermedades asociadas al catabolismo de los aminoácidos ramificados	Pilar Rodríguez Pombo
	PABLO GELLA MONTERO	Dinámica y Función del Genoma	Optimización del sistema replicativo del bacteriófago ϕ 29 para aplicaciones biotecnológicas	Margarita Salas Mario Mencía
	FULVIO SANTACATTERINA	Biología Celular e Inmunología	Metabolismo energético en patología y su traslación a la clínica	José M ^a Cuezva
	PATRICIA MARTÍN MAESTRO	Neurobiología Molecular	Mitophagy dysfunction in peripheral and neural models of Alzheimer disease	Jesús Ávila y Vega García Escudero
	ANTONIO JOSÉ MONTES RUIZ	Desarrollo y Diferenciación	Control del crecimiento en los discos imaginales de <i>Drosophila melanogaster</i>	Ginés Morata
	JAIME JURADO GÓMEZ	Desarrollo y Diferenciación	Estudio del papel de α -Catenina y otras proteínas de unión a la Actina en la contracción apical de las células de la Amnioserosa durante el Cierre Dorsal de <i>Drosophila melanogaster</i>	Nicole Gorfinkiel
	GUILLERMO SASTRE MORENO	Dinámica y Función del Genoma	Polymerases specialized in damage tolerance and DNA double-strand break repair"	Luis Blanco y José F. Ruiz
	ANA DE ORY	Dinámica y Función del Genoma	Análisis bioquímico de las proteínas de reparación del DNA Ku y Ligasa D de <i>Bacillus subtilis</i>	Miguel de Vega
	ELEANOR SIMÓN	Desarrollo y Diferenciación	Control of two morphogenetic processes during <i>Drosophila melanogaster</i> metamorphosis: fusion of imaginal disc and ecdysis	Isabel Guerrero
	ELENA POSER	Biología Celular e Inmunología	UNravelling sorcin mechanism of action in multidrug resistance tumor cells	A. Rosi Fanelli y V. Lalioti



MEMORIA CIENTÍFICA CBMSO 2015-2016

Scientific Report 2015-2016

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 /

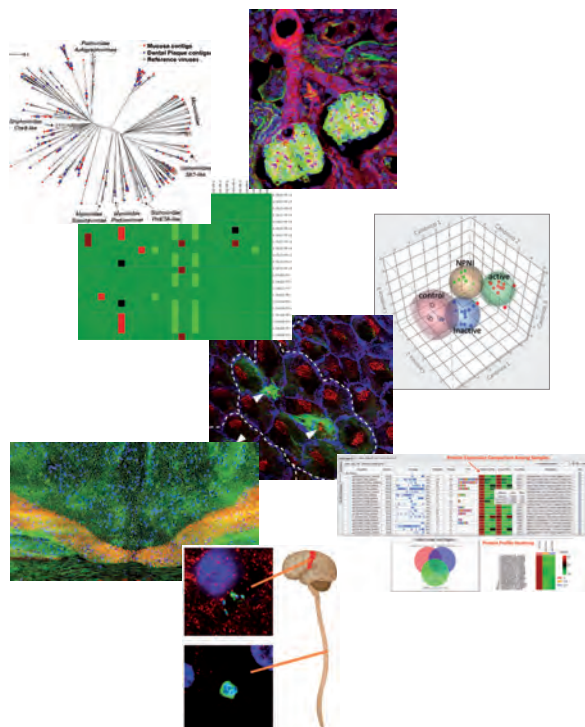
Graphic Design and Photography Services of CBMSO

(José I. Belio López y José A. Pérez Gracia)

Impresión / Printed by

Gramadosa, S.L.

Depósito Legal: M-21439-2015



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



**El CBMSO
agradece los fondos aportados por:**

**FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES**

