

Memoria científica CIB 2007-2008 Scientific report CIB 2007-2008

Memoria de la Dirección | Director's Report **2**

Programas de Investigación | Research programmes

➔ **Biología Físico-Química | Chemical & Physical Biology** **10**

➔ **Biología Medioambiental | Environmental Biology** **36**

➔ **Medicina Celular y Molecular** **58**
Cellular and Molecular Medicine

➔ **Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones** **96**
Molecular Microbiology and Infection Biology

➔ **Proliferación Celular y Desarrollo** **118**
Cell Proliferation and Development

Servicios Científicos Centrales | Central Scientific Services **137**

Actividades y Datos | Activities and Data **147**

ÍNDICE

Memoria de la Dirección Director's Report	2
Programas de Investigación Research programmes	
➔ Biología Físico-Química Chemical & Physical Biology	10
➔ Biología Medioambiental Environmental Biology	36
➔ Medicina Celular y Molecular Cellular and Molecular Medicine	58
➔ Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones Molecular Microbiology and Infection Biology	96
➔ Proliferación Celular y Desarrollo Cell Proliferation and Development	118
Servicios Científicos Centrales Central Scientific Services	137
Actividades y Datos Activities and Data	147

CIB

Memoria científica CIB 2007-2008 Scientific report CIB 2007-2008

Memoria de la Dirección Director's Report	2
Programas de Investigación Research programmes	
➤ Biología Físico-Química Chemical & Physical Biology	10
➤ Biología Medioambiental Environmental Biology	36
➤ Medicina Celular y Molecular Cellular and Molecular Medicine	58
➤ Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones Molecular Microbiology and Infection Biology	96
➤ Proliferación Celular y Desarrollo Cell Proliferation and Development	118
Servicios Científicos Centrales Central Scientific Services	137
Actividades y Datos Activities and Data	147

Memoria de la Dirección

Pasado y Presente del CIB por Vicente Larraga, Director

MADRID, ABRIL 2009



Durante el periodo que refleja la presente memoria se ha producido un hecho de especial relevancia en el Centro de Investigaciones Biológicas. En el año dos mil ocho hemos celebrado el quincuagésimo aniversario de la creación del Centro en su antiguo edificio de la calle de Velázquez. Este acontecimiento se ha celebrado con un programa de conferencias científicas durante el mes de Mayo en el que estuvieron presentes científicos españoles de primera fila como los Profesores Ginés Morata y Margarita Salas, y el Comisario Europeo de Economía Joaquín Almunia, quienes trataron temas de gran interés científico y pusieron de manifiesto la importancia de la investigación, el desarrollo y la innovación como elemento estratégico de futuro en la economía y el desarrollo social europeos. Durante el mes de Octubre, y gracias a la colaboración de la Fundación Ramón Areces, se celebró un simposio sobre estos primeros cincuenta años del CIB, cuyo contenido dará lugar a una publicación que aparecerá en los primeros meses del presente año. En este simposio se recogieron los testimonios de la importante labor científica realizada en el centro durante este periodo que ha visto el desarrollo en España de la biología moderna. Con todo ello, se puso de manifiesto la gran relevancia de la contribución del CIB a la ciencia, algunos de cuyos hitos en estas cinco décadas están recogidos en la **Figura 1**. Las celebraciones del cincuentenario se clausuraron en el mes de Noviembre con un homenaje a los antiguos miembros del centro en la persona del Profesor Julio Rodríguez Villanueva.

No obstante, el presente y el futuro es lo que debe preocuparnos y ocuparnos. El presente es bueno. La gran mayoría de los grupos del CIB se encuentran financiados por proyectos competitivos de alta exigencia de calidad, fundamentalmente de los planes nacionales del Ministerio de Ciencia e Innovación y de la Unión Europea o los Estados Unidos. El presupuesto del CIB en este bienio se refleja en la **Figura 2 A y B**.

Director's Report

Past and Present of the CIB by Vicente Larraga, Director

MADRID, APRIL 2009

During the period covered by this Scientific Report, an important date in the history of the "Centro de Investigaciones Biológicas" was reached with the celebration in 2008 of the 50th anniversary of the foundation of the centre at the old site in "Velázquez" street. This achievement was celebrated by organizing a programme of scientific conferences in May, in which the most important Spanish scientists participated, such as Professor Ginés Morata and Margarita Salas, and the European Commissioner for Financial Affairs, Joaquín Almunia, who addressed topics of great scientific interest and highlighted the importance of research, development and innovation as strategic elements in the future economic and social development of Europe. In October, and thanks to the collaboration of the "Fundación Ramón Areces", a symposium was celebrated on these first fifty years of the CIB, the content of which will be published in the initial months of this year. During this symposium, the importance of the scientific advances and efforts that have been made at the centre during this period were presented, as was their contribution to the current state-of-the-art in Biological Research in Spain. Accordingly, the relevance of the contribution of the CIB to Science in Spain was clearly evident (as reflected by some of the landmarks achieved during these five decades, presented in **Figure 1**). The 50th anniversary celebrations were brought to a close in November with the homage to the past members of the centre offered by Professor Julio Rodríguez Villanueva.

Nevertheless, we should now be more concerned about the present and the future of the CIB. The present looks very positive as the projects of the vast majority of the groups at the CIB are already financed under highly competitive programmes, essentially by the National funding programmes of the "Ministerio de Ciencia e Innovación" and by the European Commission or programmes in the USA. This is well reflected in the CIB budget shown in **Figure 2 A and B**.

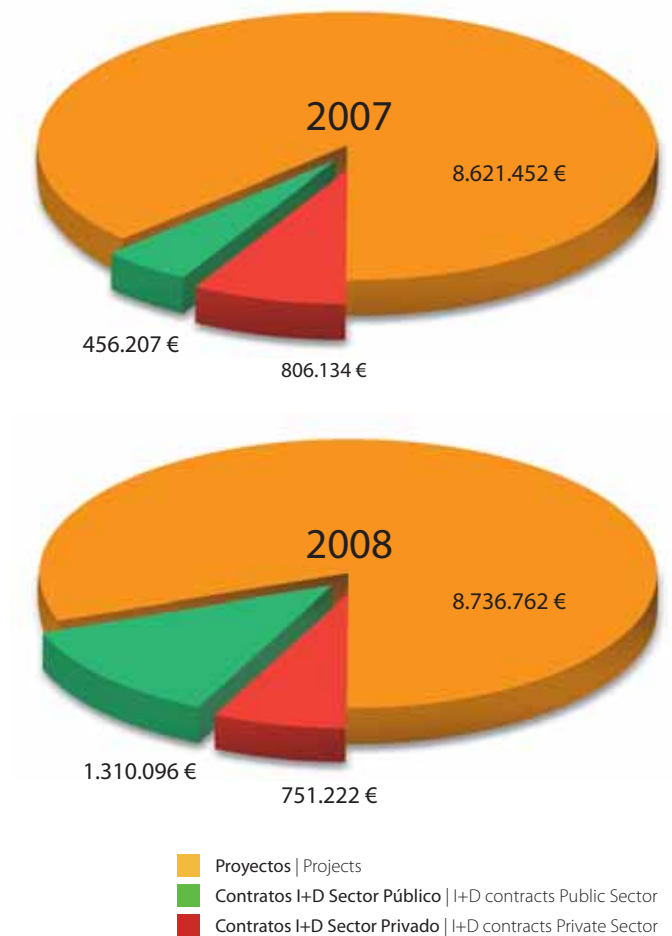


Figura 2A: Financiación externa del CIB durante los años 2007 y 2008
Figure 2A: External financing of the CIB during 2007 and 2008

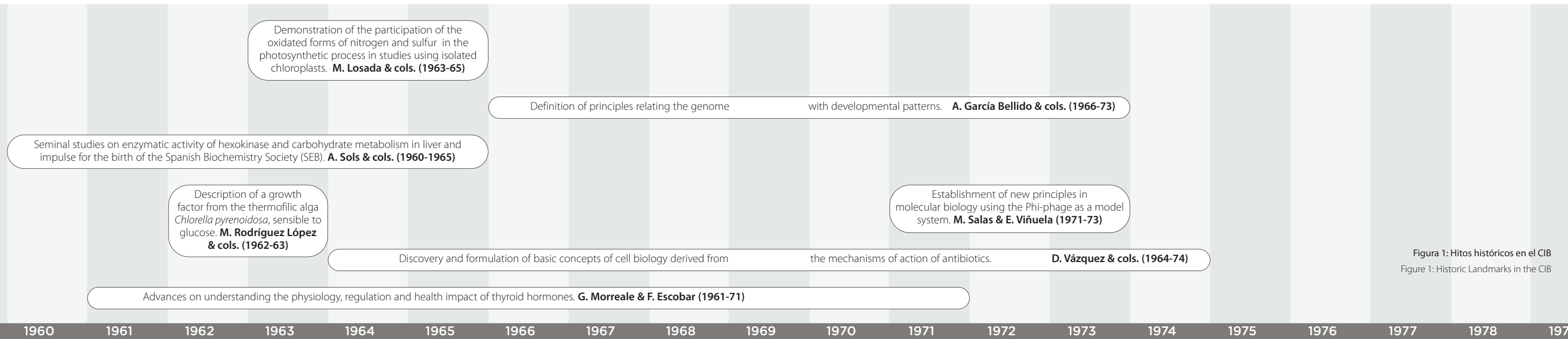
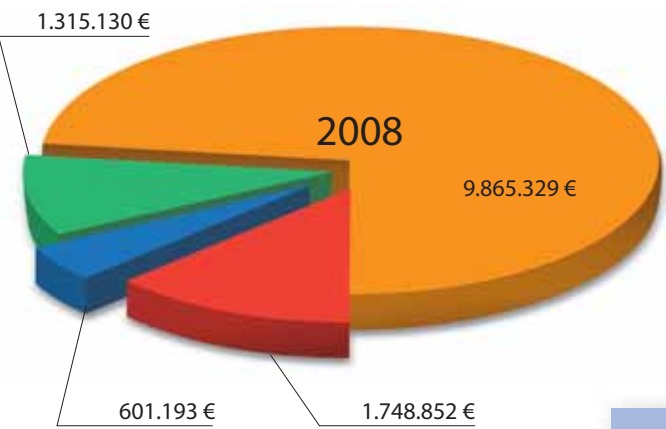
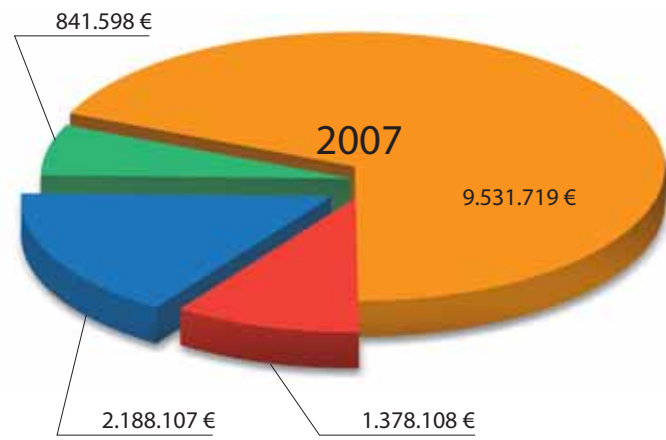


Figura 1: Hitos históricos en el CIB
Figure 1: Historic Landmarks in the CIB

1 Sols A, Cadenas E, Alvarado F (1960) *Science* 131: 297; Salas M, Viñuela E, Sols A (1963) *J Biol Chem* 238: 3535; Viñuela E, Salas M, Sols A (1963) *J Biol Chem* 238: 1175.
2 Rodríguez-Candela R, Rodríguez-López M, Castilla-Cortázar T, R-Candela JL (1962) *Nature* 195: 712; Rodríguez-López M, R-Candela R (1962) *Nature* 196: 691; Rodríguez-López M (1963) *Nature* 199: 506. 3 Paneque A, Losada M, Del Campo FF (1963) *Nature* 198: 90; Ruiz-Amil M, De Torrontegui G, Palacian E, Catalina L, Losada M (1965) *J Biol Chem* 240: 3485; Del Campo FF, Paneque A, Ramírez JM, Losada M (1965) *Nature* 205: 387. 4 Escobar F, García JM, García MD, Morreale de Escobar G (1961) *Nature* 191: 1171; Morreale de

Escobar G, Rodríguez PI, Escobar F (1962) *J Biol Chem* 237: 2041; Jolin T, Morreale G (1971) *Biochem J* 125: 869. 5 Vazquez D (1964) *Nature* 203: 257; Modolell J, Cabrer B, Parmeggi A, Vazquez D (1971) *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1796; Barbacid M, Vazquez D (1974) *J Mol Biol* 84: 603. 6 García Bellido A (1966) *Dev Biol* 14: 278; Ripoll P, García Bellido A (1973) *Nature-New Biology* 241: 15; García Bellido A, Ripoll P, Morata G (1973) *Nature-New Biology* 245: 251. 7 Ortin J, Viñuela E, Salas M (1971) *Nature-New Biology* 234: 275; Mendez E, Ramirez G, Salas M, Viñuela E (1971) *Virology* 45: 567; Carrasco JI, Viñuela E, Salas M (1973) *Virology* 56: 291.



■ Personal | Personnel
■ Presupuesto ordinario | Ordinary budget
■ Inversiones | Investments
■ Apoyo a la infraestructura | Infrastructure

Figura 2B: Financiación del CIB con presupuesto del CSIC para 2007 y 2008
 Figure 2B: Financing of the CIB from the budget of the CSIC for 2007 and 2008

Se han incorporado varios grupos nuevos para fortalecer tanto las líneas de estructura de proteínas y de estrés de plantas como la capacidad tecnológica del centro en abordajes de proteómica y análisis de alto rendimiento de moléculas con actividad terapéutica. El número de personas que trabajan en el CIB asciende a 459. De las 284 personas que constituyen el personal científico, 94 son miembros en plantilla del CSIC. La distribución por escalas y sexos aparece en la **Figura 3 A y B**. El CIB es uno de los mayores centros del Área de Biología y Biomedicina del CSIC, e incluye personal adscrito no solo a este área sino a las de Ciencias Agrarias y Ciencia y Tecnología Químicas. El centro forma parte del campus del CSIC en la Ciudad Universitaria de Moncloa.

Durante este periodo se ha producido la renovación del mandato del director (Junio de 2008) por otro periodo de cuatro años, y las vicedirecciones se han renovado con la salida del Dr. Pedro Castañera que ha pasado a ocupar la máxima responsabilidad en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agraria. Los Drs. Félix Ortego y Dolores Pérez-Sala se han incorporado a la dirección del CIB junto con la Dra. María Jesús Martínez que permanece en su puesto. Dos miembros del CIB han desarrollado tareas de gestión en el Ministerio de Sanidad: La Dra. Flora de Pablo ha permanecido un año como Directora del Instituto de Salud Carlos III y el Dr. Augusto Silva es el actual responsable de la Dirección General de Terapias Avanzadas y Trasplantes. Parece que el CIB es una cantera de buenos profesionales que en algún momento de su carrera son requeridos para tareas de gestión.

Several new groups have joined the centre to strengthen both the research lines focused on protein structure and plant stress, as well as the technological capacity of the centre in terms of proteomic approaches and high throughput analysis of molecules with therapeutic activity. There are 459 people working at the CIB. Of the 284 people belonging to the scientific staff, 94 are staff scientists at the CSIC (the staff distribution is shown by rank and sex in **Figure 3 A and B**). The CIB is one of the main Research Centres in the field of Biology and Biomedicine within the CSIC, and it not only includes personnel active in these areas but also, in the area of Agricultural Sciences and Chemical and Technology Sciences. The Centre forms part of the CSIC campus at the "Ciudad Universitaria" in Moncloa.

During this period, the Director was re-elected in June 2008 for another four year term, and the vice-directors were also re-elected except for Dr. Pedro Castañera, who was appointed as the director of the National Institute for Agricultural Science and Technology ("Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agraria"). Dr Félix Ortego and Dolores Pérez-Sala have joined the management board of the CIB, along with Dr María Jesús Martínez who remains in the position she occupied previously. Two members of the CIB have been seconded to occupy positions at the Ministry Health: Dr. Flora de Pablo served for one year as Director of the "Instituto de Salud Carlos III" and Dr. Augusto Silva is currently the Director General of Advanced Therapies and Transplants. Thus, it appears that the CIB is a breeding ground for leading professionals that at a certain moment in their careers are good candidates to carry out their duty in the national scientific governing administrative bodies.

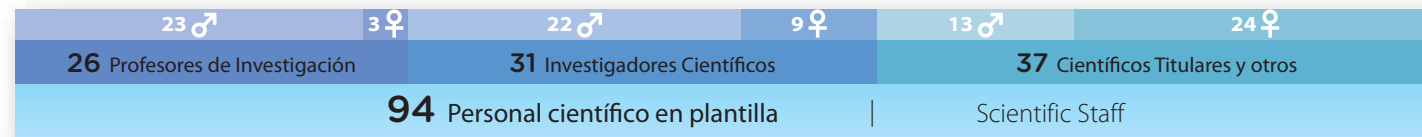


Figura 3B: Personal científico en el CIB | Figure 3B: Scientific Personnel in the CIB

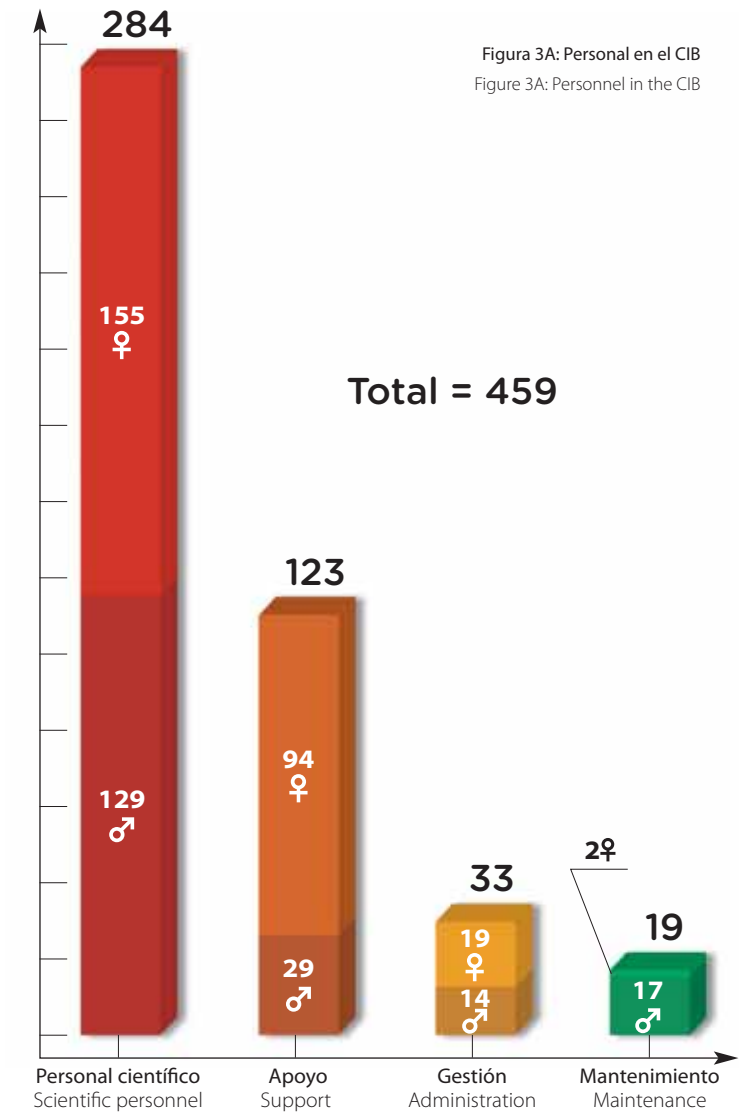
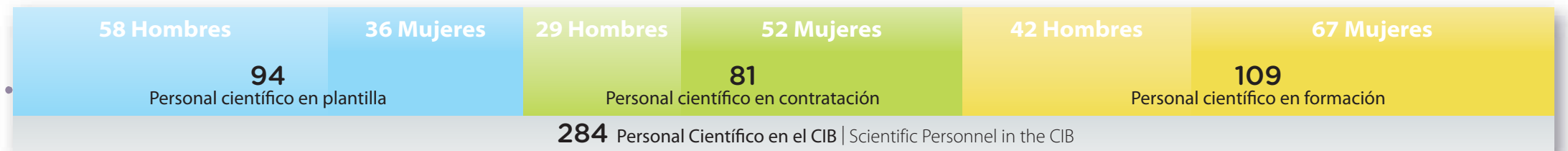


Figura 3A: Personal en el CIB
 Figure 3A: Personnel in the CIB

Cloning and expression of the *lytA* gene of *Streptococcus pneumoniae*, the first reported gene encoding a bacterial autolysin. The murein hydrolases of *S. pneumoniae* and its phages represent a paradigm of the theory of modular evolution of proteins.
R. Lopez, E. García & J.L. García (1985-88)

Discovery and isolation of the first reported human vascular endothelial cell mitogen, FGF; determination of its primary structure and demonstration of its hormone-like regulatory activity of arterial blood pressure.
G. Giménez Gallego & cols. (1985-96)

Identification and molecular cloning of the human gene responsible for alkaptonuria (AKU) and the characterization of its molecular, structural and epidemiological bases.
M. A. Peñalva & S. Rodríguez de Córdoba. (1995-2000)

Definition of the mechanism of plasmid replication by the asymmetric rolling circle, and control of plasmid replication by the combined effect of an antisense RNA and a transcriptional repressor protein.
M. Espinosa & G. del Solar (1987-98)

Elucidation of the beneficial effects of statins on cardiovascular function through the inhibition of the isoprenylation of Rho GTPases and regulation of the generation of endothelial vasoactive factors, nitric oxide and endothelin-1.
S. Lamas & D. Pérez Sala (1998-2002)

Figura 1 (cont.)
 Figure 1 (cont'd)

1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003

① García E, García JL, Ronda C, García P, López R (1985) *Mol Gen Genet* 201: 225; Sánchez-Puelles JM, Ronda C, García JL, García P, López R, García E (1986) *Eur J Biochem* 158: 289; García E, García JL, García P, Arraras A, Sánchez-Puelles JM, López R (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 914. ② Giménez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C, Rios Candelore M, DiSalvo J, Thomas KA (1985) *Science* 230: 1385; Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Giménez-Gallego G (1991) *Science* 254:1208; Cuevas P, García-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Giménez-Gallego G (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11996. ③ del Solar G, Puyet A, Espinosa M (1987) *Nucl Acids Res* 15: 5561; del Solar G, Moscoso M, Espinosa M (1993). *Mol Microbiol* 8:789; del Solar G, Giraldo G, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejeras R (1998). *Microbiol*

Biol Biol Rev 62: 434. ④ Fernández-Cañón JM, Peñalva MA (1995) *J Biol Chem* 270: 21199; Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Renedo M, Fernández-Ruiz E, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S (1996) *Nature Genet* 14: 19; Beltrán-Valero de Bernabé D, Granadino B, Porfirio B, Mayatepek E, Aquaron E, Moore MM, Festen JJM, Sanmartí R, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. (1996) *Am J Human Genet* 62:776 (1998). ⑤ Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, Sánchez-Pascual R, Hernández G, Díaz C, Lamas S (1998) *J Clin Invest* 101: 2711; Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Soria E, Lamas S (2000) *Circ Res* 87: 616; Stamatakis K, Cernuda-Morollón E, Hernández-Perera O, Pérez-Sala D (2002) *J Biol Chem* 277: 49389.

En este tiempo, y como consecuencia de una profunda reflexión, a sugerencia del Comité Científico Asesor Externo del centro, se ha llevado a cabo una reestructuración de la organización científica de los grupos del Centro de Investigaciones Biológicas que se agruparán, de ahora en adelante, en cinco programas científicos que sustituirán a los antiguos departamentos. Dentro de cada uno de los programas se encuadran varias líneas de actividad científica en las que se integran los diferentes grupos de trabajo. Esta propuesta ha sido valorada positivamente por el comité evaluador internacional del área de biología y biomedicina del CSIC.

De hecho, esta memoria se ha estructurado ya de acuerdo con esta nueva organización científica del CIB y los grupos aparecen adscritos a un programa o línea y, dentro de él, a un subprograma. Parece más adecuado que en la presentación científica del Centro de Investigaciones Biológicas se exponga esta propuesta de futuro que la estructura anterior. Los grupos se han integrado así de acuerdo a sus afinidades científicas, buscando una mayor colaboración entre ellos, así como una mayor fortaleza a la hora de proponer proyectos sólidos a los grandes programas de las agencias financiadoras nacionales e internacionales. Los programas en los que se agrupará la actividad científica del CIB son los siguientes: Biología químico-física; Biología medioambiental; Medicina celular y molecular;

Microbiología molecular y biología de las infecciones y Proliferación celular y desarrollo.

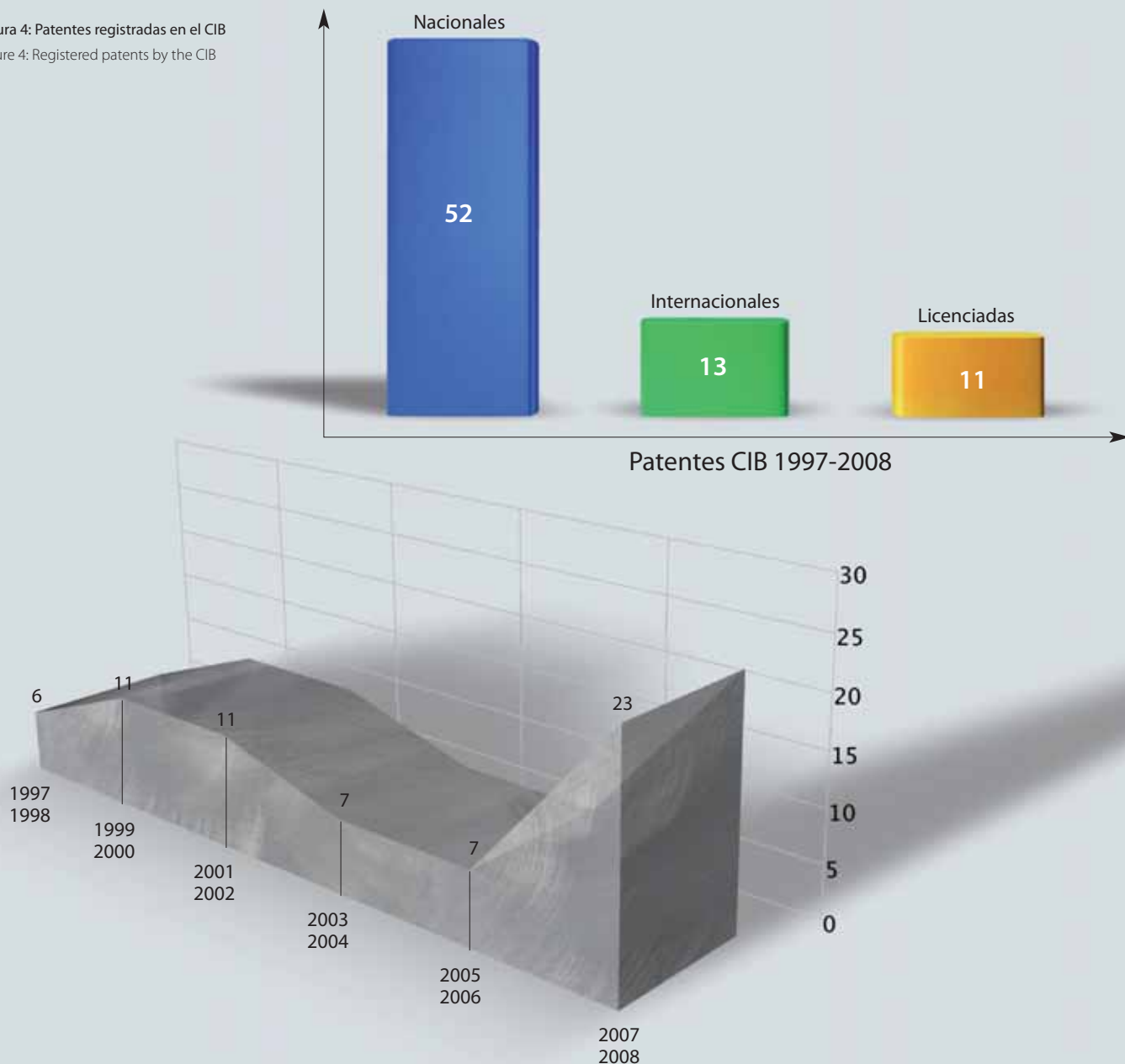
En conjunto, durante el periodo 2007-08, el Centro de Investigaciones Biológicas ha disfrutado de un periodo de consolidación científica con incrementos en el equipamiento, lo que ha permitido un mejor acceso de los grupos de trabajo a nuevas tecnologías. Esto se ha traducido en una mejora de la producción científica con un aumento significativo en las publicaciones en revistas de gran calidad (se puede ver una selección de la bibliografía al final de la memoria. Las actividades de transferencia de la investigación, que incluyen generación de patentes nacionales e internacionales, los contratos con empresas y la creación de empresas *spin-off* de base tecnológica (ver página 166), han tenido un notable impulso en la última década, y especialmente en el último bienio, en el CIB. De las 65 patentes solicitadas desde 1997, 13 han sido extendidas a PCT y 11 han sido licenciadas (Figura 4). Este periodo debe servir de base para una nueva mejora en la calidad de la producción y en el liderazgo científico de los grupos del CIB en proyectos internacionales, como siempre ha sido el espíritu del Centro de Investigaciones Biológicas. Quede aquí, para completar el recuerdo de las décadas pasadas, junto al equipo actual de dirección, las imágenes de los anteriores directores y algunas otras personas que dejaron huella en el Centro.

In this time, and as a consequence of a profound analysis by the Centre's External Scientific evaluation committee, a scientific reorganization of the groups at the "Centro de Investigaciones Biológicas" has been undertaken, gathering them into five scientific programmes that substitute the old departments. Each of the programmes encompasses various lines of scientific activity into which the different working groups are integrated. The establishment of this structure was positively evaluated by the CSIC's international assessment committee in the area of biology and biomedicine.

Indeed, this report is presented along the lines of this new scientific organization at the CIB, rather than according to its previous structure. Thus, all scientific groups are integrated into research programmes or lines, as well as into specific sub-programmes. The groups have been integrated according to their scientific affinity, searching for a greater degree of collaboration between them. In this way they are further strengthened, particularly regarding the competitiveness of the projects that can be presented to major national and international funding programmes. The programmes into which the scientific activity at the CIB has been organized are: Chemical-Physical Biology; Environmental Biology; Cellular and Molecular Medicine; Molecular Microbiology and The Biology of Infections; and Cell Proliferation and Development.

Together, during 2007-08 the "Centro de Investigaciones Biológicas" enjoyed a period of scientific consolidation and an expansion in the infrastructures, which permitted greater access of the scientific groups to new technologies. These improvements were translated into an increase in the scientific production and a significant increase in the publications in important scientific journals (a selection of these publications can be seen in appendix). The technology transfer activities, including the generation of national and international patents, the contracts with companies and the creation of technology based spin-off companies (see page xx), have provided a notable impulse at the CIB in the past decade, and especially in the last two years. Of the 65 patents applied for since 1997, 13 were developed to PCTs and 11 have been licensed (Figura 4). This period should serve as a launch pad to further improve the quality of the scientific output and to extend the scientific leadership of the CIB groups in international projects, as has always been the spirit of the "Centro de Investigaciones Biológicas". As a reminder of the decades passed, along with those of the current scientific management board, we have included in the next page the photographs of the previous directors and of other people that have left their mark on the centre.

Figura 4: Patentes registradas en el CIB
Figure 4: Registered patents by the CIB



Equipo de dirección del CIB actual (de izquierda a derecha) | Present management board (from left to right): José Luis Chavarría (Gerente | General Manager), M^a Jesús Martínez (Vicedirectora | Vicedirector), Ana Chao (Secretaria | Secretary), Vicente Larraga (Director | Director), Dolores Pérez-Sala (Vicedirectora | Vicedirector), Félix Ortego (Vicedirector | Vicedirector).

Algunos nombres del CIB de Velázquez para recordar



En 2003 el CIB se trasladó a la ciudad universitaria de Madrid siendo inaugurado el 23 de Enero de 2004 por Su Alteza Real la Infanta D^a Cristina.



El CIB en Ramiro de Maeztu (2003...)

6 Departamentos

- Biología Celular y del Desarrollo
- Biología de Plantas
- Estructura y Función de Proteínas
- Fisiopatología y Genética Molecular Humana
- Inmunología
- Microbiología Molecular

Plan estratégico 2005-2009

5 Departamentos

- Biología Celular y del Desarrollo
- Biología de Plantas
- Ciencia de Proteínas
- Fisiopatología celular y molecular
- Microbiología Molecular

Directores anteriores del CIB



Gregorio Marañón
(1958-1960)



Jesús García-Orcyoyen
(1960-1974)



Maximiano Rodríguez
(1974)

[con Avelino Pérez Geijo como Vicedirector (1961-1975)]



Antónío Portolés
(1975-1979)



Eduardo Torroja
(1980-1983)



Juan Manuel Ramírez de Verger
(1985-1987)
(1997-2002)



José Gómez-Acebo
(1984 y 1987-1990)



Juan Antonio Leal
(1990)



Lucas Sánchez
(1990-1992)



Manuel Espinosa
(1992)



Guillermo Giménez
(1993-1996)
(2002-2004)

CIB

ÍNDICE

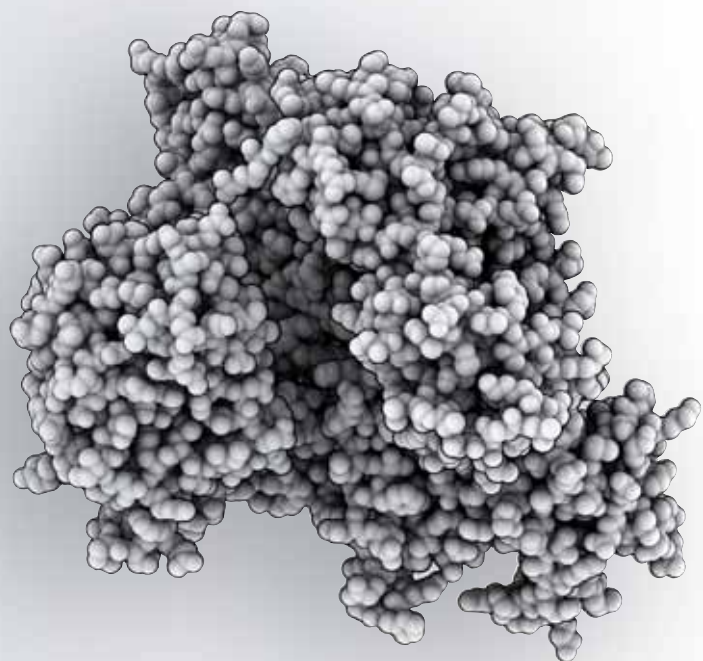


Biología Estructural y Cuantitativa Structural and Quantitative Biology

Guillermo Giménez Gallego y Antonio Romero Juan M. Ramírez de Verger, Cristina Vega	14
Jesús Jiménez Barbero y F. Javier Cañada	16
Óscar Llorca	18
Víctor Muñoz Eva de Alba	20

Reconocimiento y Ensamblaje Biomolecular Biomolecular Recognition and Assembly

José Manuel Andreu	22
Fernando Díaz y Pablo Chacón Isabel Barasoain	24
Rafael Giraldo Elena Fernández-Tresguerres	26
M ^a Dolores Pérez-Sala	28
Germán Rivas Mercedes Jiménez Sarmiento	30
Luís I. Rivas	32
Rosa M ^a . Lozano (Emergente)	34



Biología Físico-Química

Uno de los mayores retos de la biología del siglo XXI es alcanzar el nivel cuantitativo de la física y la química.

De acuerdo con esta tendencia, el principal objetivo científico del programa sobre biología físico-química (BFQ) es entender en términos cuantitativos problemas biológicos específicos a distintos niveles de complejidad, desde la escala de molécula única hasta la de ensamblajes macromoleculares subcelulares. Estos conocimientos permitirán predecir, controlar y manipular funciones biológicas esenciales, lo que se traducirá en aplicaciones biomédicas y/o biotecnológicas. Para alcanzar estos retos el programa BFQ reúne una poderosa combinación de fortalezas en biología estructural, bioquímica mecanística, biofísica molecular y biología computacional que está organizado en dos subprogramas: i) biología estructural y cuantitativa, y ii) reconocimiento y ensamblaje biomolecular. Desde el punto de vista metodológico la investigación de BFQ combina a) herramientas físico-químicas y biológicas para obtener información estructural de alta resolución, temporal y global (molécula única versus comportamiento colectivo) de los eventos moleculares que controlan los fenómenos biológicos, con b) una larga experiencia

contrastada en la identificación, aislamiento, caracterización cuantitativa, modificación e ingeniería de péptidos, proteínas y ensamblajes macromoleculares implicados en procesos celulares esenciales. Los esfuerzos de investigación en BFQ abarcan desde procesos fundamentales (como la estructura, el plegamiento, la agregación y la evolución de proteínas, la función y la regulación de proteínas, la energética y la dinámica de interacciones biomoleculares) hasta los más aplicados hacia el desarrollo de nuevas sustancias con interés farmacológico, como por ejemplo, nuevos antibióticos. Estos proyectos cubren desde el análisis estructural y funcional de problemas biológicos específicos (como la replicación y la reparación del DNA, la división celular, el cáncer, la angiogénesis, la acción de antibióticos y la resistencia frente a los mismos, las modificaciones post-traduccionales, la estructura de la cromatina) hasta la reconstitución in vitro y la ingeniería de máquinas macromoleculares sub-celulares. El programa BFQ pretende combinar estos esfuerzos de investigación y esta experiencia multidisciplinar en una estructura común que promueva las colaboraciones dentro del programa, con otros investigadores del CIB, así como las extramurales, y la optimización de la infraestructura instrumental avanzada que se requiere para esta investigación.

Chemical & Physical Biology

A major challenge for Biology in the 21st century is to reach the quantitative level of Physics and Chemistry.

Hence, the main research goal of CPB is to gain a quantitative understanding of specific biological problems at different levels of complexity, from the single molecule level to sub-cellular macromolecular assemblies. This knowledge will enable to predict, control and engineer essential biological functions towards biomedical and/or biotechnological applications. In order to meet these challenges, the CPB programme gathers a powerful combination of strengths in Structural Biology, Mechanistic Biochemistry, Molecular Biophysics, and Computational Biology that is organized in two subprogrammes: i) Structural and Quantitative Biology and ii) Biomolecular Recognition and Assembly. Methodologically, research at CPB involves the combination of physical chemical and biological methods to attain high-resolution structural, temporal and ensemble (single molecule versus collective behavior) information of the molecular events controlling biological phenomena, with well-established expertise in the identification, isolation, quantitative characterization, modification, and engineering of peptides, proteins and macromolecular assemblies involved

in essential cellular processes. CPB research efforts range from fundamental processes (such as protein structure, folding, aggregation and evolution, protein function and regulation, energetics and dynamics of biomolecular interactions), to more applied efforts towards developing new substances with pharmacological interest, such as new antibiotics. These projects cover from the structural and functional analysis of specific biological problems (such as DNA replication and repair, cell division, cancer, angiogenesis, antibiotic action and resistance, programmed cell-death, post-translational modifications, and chromatin structure) to the in vitro reconstitution and engineering of sub-cellular macromolecular machines. The CPB programme aims to combine these research efforts and multidisciplinary expertise into a common structure fostering collaboration within CPB and with other researchers at CIB and outside, and optimization of the large-scale instrument infrastructure required for this research.

Guillermo Giménez-Gallego

Profesor de Investigación
gimenez_gallego@cib.csic.es



Ph.D. Universidad Autónoma de Madrid, 1977.
Académico de Número de la Real Academia de Farmacia. Profesor Agregado de la Univ. Autónoma de Madrid (1977-1982).
Director de la División de Biología, 1980-1982. Universidad Autónoma de Madrid
Investigador de plantilla, 1984-1988. Merck Institute for Therapeutic Research (USA).
Profesor de Investigación, 1993. CIB, CSIC.
Director, 1993-1997 y 2002-2004. CIB, CSIC.
Miembro de la Junta de Gobierno, 1996-2004. CSIC.

Antonio Romero Garrido

Profesor de Investigación
romero@cib.csic.es



Ph.D. Complutense de Madrid, 1987.
Postdoctoral Université de Rennes I, Francia y Max-Planck Institut für Biochemie, Munich, Alemania.
Científico Titular, 1990. CIB, CSIC.
Jefe de Grupo CIB, 1997. CIB, CSIC.
Profesor de Investigación, 2008. CIB, CSIC.

Investigadores del equipo | Staff Scientists:

Juan Manuel Ramírez de Verger
Cristina Vega

Otros Miembros | Other lab Members:

María Jesús Mate Pérez
Margarita Carrascosa Cebrián
María del Pilar López Navajas
Fabiola Rodríguez Calviño
Israel Sánchez Fernández
Elena Santillana Heras

Biología Estructural y Cuantitativa
Structural and Quantitative Biology

Cristalografía de Rayos-X e Ingeniería de Proteínas
X-Ray Crystallography and Protein Engineering

Nuestro grupo se centra en el estudio de las macromoléculas a nivel atómico. Para ello, utilizamos técnicas de alta resolución, la cristalografía de rayos x y, ocasionalmente la resonancia magnética nuclear para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas y sus complejos. Empleamos, además, una amplia variedad de técnicas biofísicas complementarias. La ingeniería de proteínas constituye un pilar adicional esencial de nuestros estudios que últimamente buscan caracterizar los aspectos estáticos y dinámicos de sistemas que juegan papeles clave en los procesos tumorales, las enfermedades angiodependientes, las infecciones bacterianas y las resistencias a antibióticos. Finalmente, nuestro objetivo último es contribuir al diseño de nuevas drogas.

Our group focuses on the study of macromolecules at the atomic level. Accordingly, we use high resolution techniques, primarily X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance when necessary, to determine the three-dimensional structure of proteins and their complexes. In addition, we also employ a wide variety of complementary biophysical techniques and indeed, protein engineering is a key element in our studies to characterize static and dynamic aspects of tumoural processes, angiogenic dependent pathologies, bacterial infection and antibiotic resistance. Our ultimate goal is to advance the discovery of new leads for drug design.

El objetivo de nuestra investigación actual es caracterizar a nivel atómico una serie de proteínas implicadas en diferentes patologías humanas con el objeto de comprender los mecanismos desplegados por estos sistemas a nivel molecular. Se centrará en el análisis por cristalografía de rayos-X y otras técnicas biofísicas de una serie de proteínas diana – factores de transcripción CEBPβ y CEBPζ (CHOP), la proteína codificada por el oncogen FUS-CHOP, la proteína SEVI, proteínas de resistencia bacteriana (β-lactamasas y porinas) y los complejos

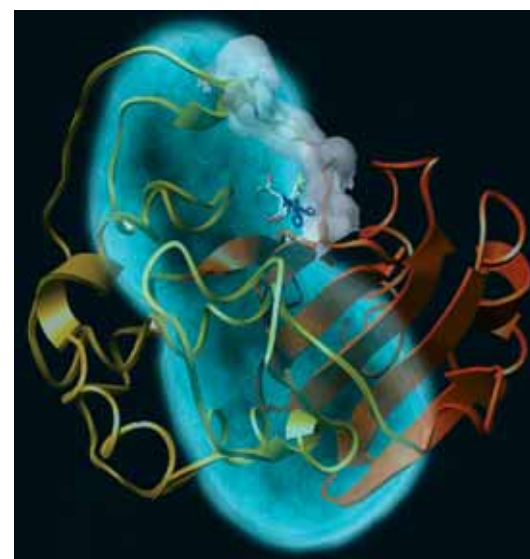


Fig. 1. Representación estructural de OXA-24, una carbapenemasa de clase D aislada de una cepa clínica multirresistente de *Acinetobacter baumannii* (el fondo muestra una microfotografía electrónica de la bacteria). El túnel de entrada al sitio activo, con una molécula de imipenem, está delimitado por dos residuos que parecen ser esenciales para la eficiencia catalítica contra carbapenémicos.

Structural representation of OXA-24, a class D carbapenemase isolated from a multiresistant clinical strain of *Acinetobacter baumannii* (the background shows an electron microphotograph of the bacteria). The tunnel entrance to the active site, with a docked imipenem molecule, is defined by two key residues that seem to be essential for the catalytic efficiency against carbapenems.

del factor de crecimiento para fibroblastos – que juegan un papel importante en procesos tumorales, enfermedades angio-dependientes, infección bacteriana y resistencia antibiótica. Aunque el proyecto es fundamentalmente de investigación básica, consideramos que aborda problemas candentes para la salud utilizando aproximaciones muy rigurosas, pues en todos los casos tratan de establecer las bases moleculares de procesos patológicos que afectan a la población. Estos resultados podrían llevar al diseño específico de nuevos compuestos que puedan dar lugar a posibles terapias alternativas a las que se están utilizando actualmente.

The aim of our current research is to characterize, at the atomic level, a series of proteins involved in different human pathologies in order to understand their pathological implications. X-ray crystallography and other biophysical techniques are used to analyze target proteins that play an important role in tumour development, angiogenic dependent pathologies, bacterial infection and antibiotic resistance, namely: the transcription factors CEBPβ and CEBPζ (CHOP); the protein encoded by the FUS-CHOP oncogene; the SEVI protein; bacterial resistance proteins (β-lactamasas and porins); and fibroblast growth factor complexes. Although these studies mainly focus on basic research, we believe that they cover topics closely related to current health problems, applying rigorous approximations to establish the molecular mechanisms underlying different human pathologies. It is foreseeable that the results of this research will provide new leads to develop novel therapeutic approaches aimed at treating a range of important diseases.

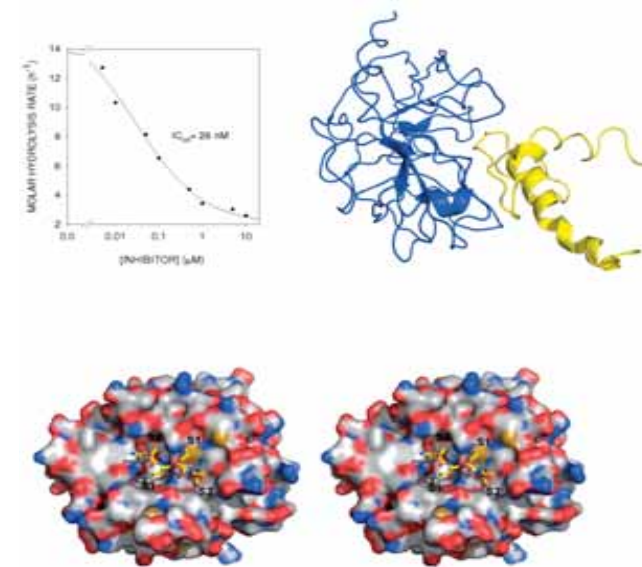


Fig. 2. Inhibición de la actividad de hK7 por LD6 y representación del modelo molecular de la interacción hK7/LD6. A, cinética de la inhibición de hK7 en presencia de cantidades crecientes de LD6. B, modelo molecular para la interacción hK7/LD6. C, representación del sitio activo de hK7 dónde la superficie molecular se representa coloreada de acuerdo al potencial electrostático.

Inhibition of hK7 activity by LD6 and a molecular model of the hK7/LD6 interaction. A, Kinetic inhibition assay of hK7 in the presence of increasing amounts of LD6. B, Molecular model proposed for the hK7/LD6 interaction. C, active site cleft of hK7 in stereo, represented as a solid surface and coloured according to the electrostatic surface potential.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Fernández, I.S., Ständker, L., Mägert, H.-J., Forssmann, W.-G., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2008). Crystal structure of human epidermal kallikrein 7 (hK7) synthesized directly in its native state in *E. coli*: Insights into the atomic basis of its inhibition by LEKT1 Domain 6 (LD6). *J. Mol. Biol.* 377, 1488-1497.

Pérez-Llarena, F.J., Cartelle, M., Mallo, S., Beceiro, A., Pérez, A., Villanueva, R., Romero, A., Bonnet, R., and Bou, G. (2008). Structure-function studies of arginine at position 276 in CTX-M beta-lactamasas. *J. Antimicrob. Chemoth.* 61, 792-797.

Fernández, I.S., Ständker, L., Forssmann, W.-G., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2007). Crystallization and preliminary crystallographic studies of human kallikrein seven (hK7), a serin-protease of the multigene kallikrein family. *Acta Crystallogr. F* 63, 669-672.

Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., Giménez-Gallego, G., Sánchez, P.C., Fowler, D.-M., Koulov, A., Kelly, J.-W., Mothes, W., Grivel, J.-C., Margolis, L., Keppler, O.T., Forssmann, W.-G., and Kirchhoff, F. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059-1071.

Santillana, E., Beceiro, A., Bou, G., and Romero, A. (2007). Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *PNAS* 104, 5354-5359.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=40>



Patentes | Patents

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Lozano Puerto, R.M., Romero Garrido, A., and Valverde López, S. "Use of 2,5-dihydroxybenzene derivatives for the treatment of angiogenic diseases." WO patent application: 2008/020031, Pub. Date: 21-02-2008, CT/EP2007/058444. Transferida a Action Medicines, S.L.

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Lozano Puerto, R.M., Romero Garrido, A., and Valverde López, S. "2,5-dihydroxybenzene sulfonic acid derivatives for the treatment of fibrosis." WO patent application: 2008/020040. Pub. Date: 21-02-2008, PCT/EP2007/058454. Transferida a Action Medicines, S.L.

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Valverde López, S., Romero Garrido, A., and Lozano Puerto, R.M. "2,5-dihydroxybenzene derivatives for the treatment of dermatitis." WO patent application: 2008/020026, Pub. Date: 21-02-2008, CT/EP2007/058439. Transferida a Action Medicines, S.L.

Jesús Jiménez Barbero

Profesor de Investigación
jjbarbero@cib.csic.es



PhD, 1987.
Universidad Autónoma de Madrid.

Postdoctoral,
Universidad de Zürich, National Institute for Medical Research, Mill Hill, Reino Unido, y Carnegie Mellon University de Pittsburgh, EE.UU.

Científico Titular, 1988.
IQOG, CSIC.

Investigador Científico, 1996.
IQOG, CSIC.

Profesor de Investigación, 2002.
CIB, CSIC.

Francisco Javier Cañada Vicinay

Profesor de Investigación
jcanada@cib.csic.es



PhD, 1985.
Universidad del País Vasco.

Postdoctoral
Centro de Biología Molecular, Harvard Medical School, Instituto de Química Orgánica General.

Científico Titular, 1992.
IQOG, CSIC.

Investigador Científico, 2004.
CIB, CSIC.

Profesor de Investigación, 2009.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Ana Ardá Freire
Kouzaima El Biari
Luis P. Calle
María Dolores Díaz Hernández
María del Carmen Fernández Alonso
Marco Fontanella
José Juan Hernández Gay
Filipa Marcelo
María Morando
Lidia Nieto Garrido
Joao P. Ribeiro
José Ignacio Santos
Chiara Venturi

Biología Estructural y Cuantitativa
Structural and Quantitative Biology

RMN y Reconocimiento Molecular
NMR and Molecular Recognition

El objetivo global de la investigación de nuestro grupo se centra en el estudio de los parámetros que controlan el reconocimiento molecular de ligandos por sus receptores en sistemas de interés biofarmacéutico con especial énfasis en las interacciones entre carbohidratos y proteínas. Para alcanzar este objetivo es necesario un abordaje pluridisciplinar que incluye dos aspectos principales: 1. Diseño y síntesis de moléculas de interés como herramientas para el estudio del reconocimiento molecular y/o con potencial actividad biológica. 2. Caracterización de los factores estructurales que gobiernan los procesos de reconocimiento molecular de esos ligandos por distintas biomoléculas.

The overall goal of our research is to study the molecular recognition of ligands by receptors in systems of biopharmaceutical interest, paying special attention to protein-carbohydrate interactions. This goal may only be reached through a plueridisciplinary approach that is focused on two main areas: 1. The design and synthesis of molecules relevant to molecular recognition studies and/or with potential biological activity; 2. The characterization of the structural elements that govern the molecular recognition of such ligands by different biomolecules.

Con estos objetivos en mente en el laboratorio empleamos una variedad de técnicas y métodos experimentales y teóricos, principalmente basados en la RMN que permiten determinar y caracterizar las estructuras y conformaciones de los receptores, los ligandos y sus complejos así como caracterizar la energética y dinámica de los procesos de reconocimiento molecular. Este conocimiento es esencial para la comprensión de los diferentes factores que gobiernan estos procesos y constituye una etapa fundamental en el diseño de fármacos basado en la estructura. Mediante la combinación de métodos de RMN complementados por protocolos computacionales es posible estudiar la estructura y flexibilidad de los ligandos naturales y sus miméticos en disolución. En presencia de un receptor, la RMN también permite conocer la conformación del ligando y del receptor en el estado asociado. Además de los contactos ligando-receptor, otros factores como la pérdida de libertad conformacional del ligando y la reorganización del disolvente pueden contribuir a la energética del proceso de reconocimiento. El estudio cinético y termodinámico de las interacciones en solución permite la determinación de los mecanismos y contribuciones relativas de la entalpía y la entropía en los procesos de reconocimiento. Actualmente estamos estudiando la importancia, en los procesos de reconocimiento proteína-azúcar, de las interacciones carbohidrato-aromático así como la estructura y dinámica de diversos sistemas biológicos proteína-ligando: galectinas/-galactósidos; factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)/heparina; DC-Sign/manosidos y Dectin/glucanos en el sistema inmune; Tubulina/ agentes antitumorales; receptores de factores de nodulación y otros receptores derivados de quitina. El conocimiento adquirido es

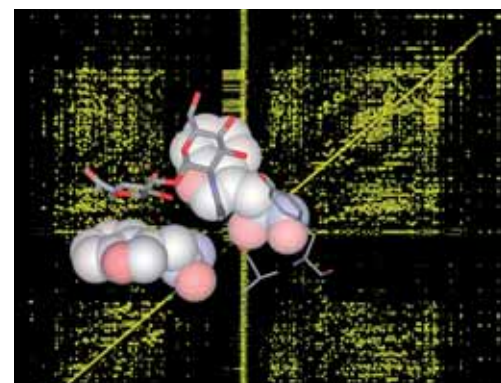


Fig. 1. Espectro NOESY de una proteína que reconoce carbohidratos. La inserción muestra una interacción de apilamiento entre el azúcar y el anillo aromático de un residuo de triptófano. NOESY NMR spectra of a carbohydrate binding protein. Insert: binding site showing the stacking interaction between the carbohydrate and the aromatic tryptophan.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Canales, A., Matesanz, R., Gardner, N.M., Andreu, J.M., Paterson, I., Díaz, J.F., and Jiménez-Barbero, J. (2008). The bound conformation of microtubule-stabilizing agents: NMR insights into the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. *Chemistry Eur. J.* 14, 7557-7569.

Fehér, K., Groves, P., Batta, G., Jiménez-Barbero, J., Muhle-Goll, C., and Kövér, K.E. (2008). Competition saturation transfer difference experiments improved with isotope editing and filtering schemes in NMR-based screening. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 17148-17153.

Sillipo, A., Zhang, Z., Cañada, F.J., Molinaro, A., Linhardt, R.J., and Jiménez-Barbero, J. (2008). Conformational analysis of a dermatan sulfate-derived tetrasaccharide by NMR, molecular modeling, and residual dipolar couplings. *Chembiochem.* 9, 240-252.

Vandenbussche, S., Díaz, D., Fernández-Alonso, M.C., Pan, W., Vincent, S.P., Cuevas, G., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., and Bartik, K. (2008). Aromatic-carbohydrate interactions: an NMR and computational study of model systems. *Chemistry Eur. J.* 14, 7570-7578.

Zhang, Z., McCallum, S.A., Xie, J., Nieto, L., Corzana, F., Jiménez-Barbero, J., Chen, M., Liu, J., and Linhardt, R.J. (2008). Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12998-13007.

Ver más en: http://www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=40



usado para el diseño de nuevos ligandos con el objetivo de controlar estos procesos biológicos o incluso diseñar receptores (lectina) artificiales. Varios de estos proyectos se llevan adelante en estrecha colaboración con otros grupos de investigación tanto del programa CPB como del CIB y otros centros nacionales e internacionales.

With these general objectives in mind, we employ a variety of experimental and theoretical methods and techniques, mainly based on NMR. It is clear that drug design based on structure must be founded on an understanding of the different factors that govern ligand recognition. Thus, it is essential to determine the structure and conformations of ligands, receptors and their complexes, as well as to characterize the energetics and dynamics of the molecular recognition processes. The structure and flexibility of natural ligands in solution, and of their mimetics, may be investigated by combining NMR and computational methods. In the presence of a receptor, NMR enables the conformation of the ligand and receptor in the bound state to be determined. In addition, the ligand-receptor contacts, as well as other factors like the loss of conformational freedom of the ligand and solvent reorganization, may contribute to the energetics of recognition. Kinetic and thermodynamic studies of the interaction in solution enable the mechanisms and the relative contribution of enthalpy and entropy in the recognition process to be determined. Currently, we are studying the importance of carbohydrate-aromatic interactions in protein/sugar recognition events and the structure and dynamics of several protein/ligand (or synthetic analogs) complexes: Galectins/Galactosides; Fibroblast growth factor (FGF)/heparin; DC-Sign/mannosides and Dectin/glucans from the immune system; Tubulin/antitumor agents; Nodulation factor receptors and other chitin receptors. This knowledge can be used to design new ligands to manipulate those biological processes or new artificial lectins. Some of these projects are run in tight collaboration with other research groups from the CPB programme and other research programmes at the CIB, as well as other National or International Institutions.

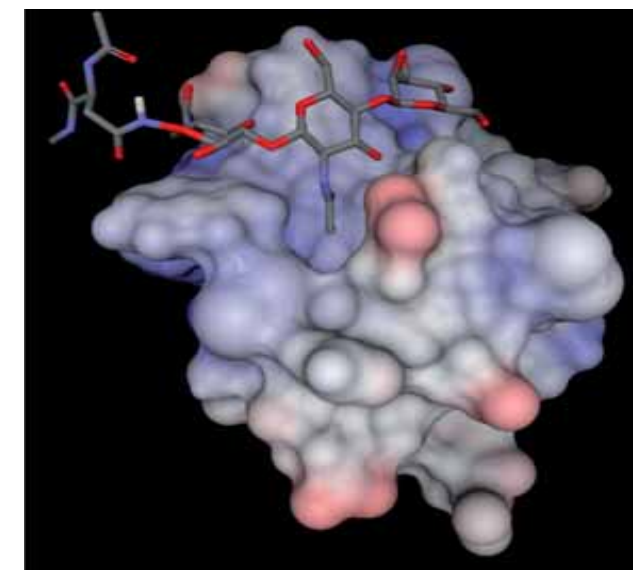


Fig. 2. Estructura, determinada mediante RMN, del complejo formado por heveína y el esqueleto trisacárido de las cadenas de glicano de las N-glicoproteínas.

NMR structure of the complex between hevein and the trisaccharide core of glycan chains of N-glycoproteins.



Óscar Llorca
 Profesor de Investigación
 ollorca@cib.csic.es

Graduate in Biology, 1992.
 University of Navarre.

PhD in Molecular Biology, 1996.
 Autonomous University of Madrid.

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid
 (1992-2000).

Marie Curie EU fellow, 2000-2002.
 Institute of Cancer Research, London, UK.

Científico Titular CSIC, 2002.
 CIB, CSIC.

Profesor de Investigación, 2009.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Ernesto Arias Palomo
- Begoña García Álvarez
- Rafael Núñez Ramírez
- Ángel Rivera Calzada
- Israel Sánchez Fernández
- María Ángeles Recuero Checa
- Eva María Torreira Ontiveros

Biología Estructural y Cuantitativa
 Structural and Quantitative Biology

**Microscopía Electrónica y
 Reconstrucción Tridimensional de
 Macromoléculas**

**Electron Microscopy and Three
 Dimensional Reconstruction of
 Macromolecules**

Un gran número de funciones celulares son realizadas por grandes complejos macromoleculares de estructura y composición dinámica, conocidos como "máquinas macromoleculares". Existe una estrecha relación entre los mecanismos moleculares que rigen estas "máquinas" y su estructura, pero la determinación de su estructura 3D presenta todavía enormes dificultades. La Microscopía Electrónica Molecular permite visualizar grandes complejos macromoleculares coexistiendo en múltiples estados conformacionales, proporcionando una información única sobre sus movimientos y funciones.

Many essential cell functions are performed by large and dynamic macromolecular assemblies, commonly known as "molecular machines", whose activity is directly coupled to their function. There is an intimate connection between the molecular control of these "machines" and their structure, yet determining their 3D structure still represents a significant challenge. Molecular Electron Microscopy permits large macromolecular complexes to be visualised in coexisting conformational states, providing unique information about their movements and functions.



Óscar Llorca estableció su grupo de investigación en el CIB en Junio de 2002 con el objetivo de explorar la estructura 3D y las funciones de grandes máquinas macromoleculares. El grupo utiliza el microscopio electrónico como herramienta fundamental para visualizar moléculas individuales de grandes ensamblados macromoleculares. Las imágenes de moléculas individuales son utilizadas para resolver su estructura 3D utilizando herramientas de procesamiento digital de imágenes. El grupo emplea además otras técnicas estructurales y de biología molecular para examinar la función de grandes complejos macromoleculares.



Las investigaciones actuales del grupo se centran en el estudio de varios complejos macromoleculares de "vigilancia", esenciales para la viabilidad celular, que funcionan como elementos de respuesta a señales de estrés, tales como las lesiones en el ADN o los bajos niveles de nutrientes y energía. Nuestro

Fig. 1. La proteína del complemento C3b (a la derecha) y sus complejos con el factor B, la C3 pro-convertasa (en el centro) y la convertasa activa C3 (C3bBb) (a la izquierda), juegan un papel clave en la inmunidad innata. Imágenes de microscopía electrónica de moléculas individuales de complejos C3bB y C3bBb fueron empleadas para determinar la estructura 3D de la pro-convertasa y la convertasa activada. (Adaptado de Torreira et al. PNAS 2009).

The complement C3b molecule (right) and its complexes with factor B, the C3 pro-convertase (C3bB, center) and the active C3 convertase (C3bBb, left), play crucial roles in innate immunity. Electron microscopy images of single C3bB and C3bBb complexes were used to perform the 3D reconstruction of the pro-convertase and active convertase. (Modified from Torreira et al. PNAS 2009).

grupo ha proporcionado publicaciones influyentes en el área de la reparación de daños en el ADN, por ejemplo resolviendo la estructura de un complejo de reparación de lesiones en el ADN formado por tres proteínas (DNA-PKcs, Ku70 y Ku80) ensambladas sobre un fragmento de ADN que mimetizaba un ADN dañado. Además, se ha descrito un posible complejo sináptico haciendo de puente entre dos extremos de ADN dañado. El grupo ha caracterizado además otros complejos implicados en la remodelación de cromatina que son necesarios para abrir la cromatina y permitir el acceso al ADN de la maquinaria de reparación. Así mismo, se han caracterizado complejos formados por la proteína TOR, que actúan como controles centrales del crecimiento celular. Más recientemente, hemos comenzado a investigar la estructura de otra gran máquina macromolecular, la convertasa C3 de la ruta alternativa de activación del complemento (en colaboración con el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba), para diseccionar los mecanismos estructurales que controlan sus funciones.

In June 2002, Oscar Llorca established his own group at the CIB with the goal of exploring the 3D structure and function of large macromolecular machines. The group uses the electron microscope as its main tool to visualise individual molecules of large macromolecular assemblies. Images of single molecules are then used to solve their 3D structure using image processing techniques. In addition, the group employs other structural and molecular biology approaches to examine the function of large macromolecular complexes.

Current research focuses on several large multi-subunit surveillance complexes that function as response elements in stress signalling pathways that are essential for cell survival, for instance those responding to DNA damage or low nutrient/energy conditions. The group has published influential studies in the area of DNA repair, resolving the structure of a Non-Homologous End-Joining complex containing three proteins (DNA-PKcs, Ku70 and Ku80) assembled on a DNA fragment that mimics a broken DNA end, as well as describing a putative synaptic complex bridging two damaged DNAs. The group is also characterising complexes involved in chromatin remodelling that open the chromatin to give the DNA repair machinery access, as well as complexes containing the TOR protein, critical in the control of cell growth. More recently, the group has begun to investigate the structure of other large macromolecular "machines", such as the alternative pathway complement C3 convertase (in collaboration with the group of

Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba), defining the structural mechanisms underlying its functions.

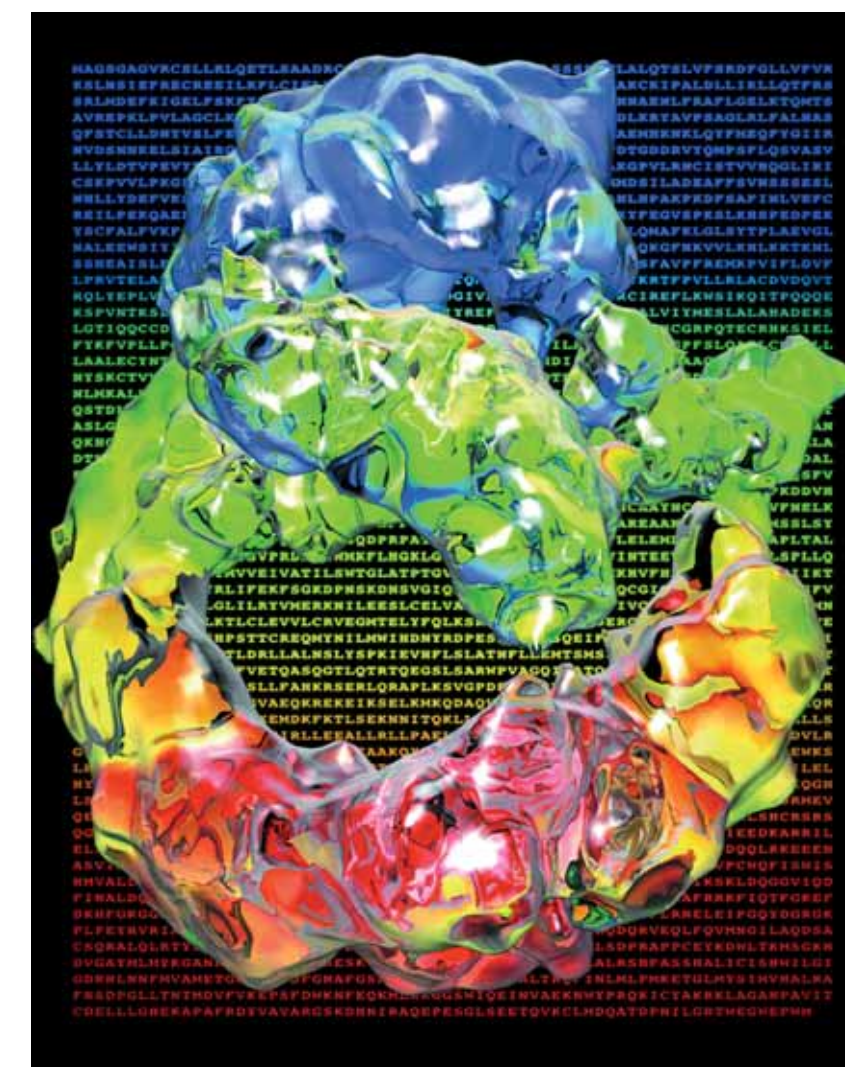


Fig. 2. Estructura 3D de DNA-PKcs, una proteína de reparación de lesiones en el ADN, resuelta por nuestro grupo, en transparente sobre su secuencia de aminoácidos (imagen cortesía de Laurence H. Pearl, Angel Rivera and Oscar Llorca).

3D structure resolved by our group of DNA-PKcs, a protein that repairs DNA damage, shown superimposed on its amino acid sequence. Image courtesy of Laurence H. Pearl, Angel Rivera and Oscar Llorca.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Torreira, E., Tortajada, A., Montes, T., Rodríguez de Córdoba, S.*#, and Llorca, O.*#. (2009). 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. **Proc Natl Acad Sci USA** 106: 882-7 (*Equal first and last author, # correspondence author).

Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O., and Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. **Nature** 455, 124-127.

Torreira, E., Jha, S., López-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacón, P., Cañas, C., Ayora, S., Dutta, A., and Llorca, O. (2008). Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. **Structure** 16, 1511-15120.

Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. **Mol. Cell** 22, 511-519.

Adami, A., García-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., and Llorca, O. (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. **Mol. Cell** 27, 509-516.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/en/grupo.php?idgrupo=47>



Victor Muñoz van den Eynde

Profesor de Investigación
vmunoz@cib.csic.es

PhD, 1995.
Lab. Europeo de Biología Molecular (EMBL) y Universidad Autónoma de Madrid.
Postdoctoral, 1996-2000.
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
Assistant Professor, 2000-2005.
Universidad de Maryland, USA.
Associate Professor, 2005-2009.
Universidad de Maryland, USA.
Profesor de Investigación, 2007.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Eva de Alba Bastarrechea

Otros Miembros | Other lab Members:

Luis Alberto Campos Prieto
Michele Cerminara
Athi Naganathan
Mourad Sadqi
David de Sancho Sánchez
Susana Barrera Vilarmau
Tanay Desai
Lorenzo Sborgi
Ravishankar Ramanathan

Fig. 1. Una proteína artificial identificada recientemente como un modelo experimental de plegamiento primordial (plegamiento en épocas prebióticas) cambia de exhibir dinámica conformacional vídriosa (izquierda) a exhibir una cinética de plegamiento simple y eficiente cuando la temperatura alcanza 323 K.

An artificial protein recently identified as an experimental model of primordial folding (folding during pre-biotic evolution) switches from glassy conformational dynamics (left) to simple efficient folding kinetics (right) when the temperature reaches 323 K.

Biología Estructural y Cuantitativa
Structural and Quantitative Biology

Biofísica de Proteínas
Protein Biophysics

Nuestro grupo investiga las conexiones entre estructura tridimensional de proteínas, plegamiento, diseño, evolución y función biológica. Nuestra aproximación es multidisciplinar, combinando física, espectroscopía, química de proteínas, y biología molecular-celular. Empleamos técnicas de resonancia magnética nuclear, cinética ultrarápida, experimentos en moléculas únicas, y supercomputación, con el objetivo desarrollar métodos, herramientas y nuevos conceptos en la biofísica de proteínas.

Our group investigates the structure and conformational behaviour of proteins in the context of folding, protein evolution and biological function. We adopt a multidisciplinary approach, combining condensed matter physics, physical chemistry, computer science, protein chemistry, and molecular and cell biology. We employ nuclear magnetic resonance, ultrafast kinetic techniques, single molecule studies and high performance computing to develop methods, tools and new concepts in protein biophysics.

Plegamiento de Proteínas Experimental

Para explorar la nueva área de investigación propiciado por el descubrimiento del plegamiento sin barreras (downhill) estamos investigando un catálogo de patrones estructurales fundamentales o arquetipos de plegamiento. Para esto usamos RMN, técnicas de cinética ultrarápida, de moléculas únicas, y abordajes computacionales, a la vez que desarrollamos nuevos métodos de análisis experimental.

Plegamiento "Downhill" y Reostatos Moleculares

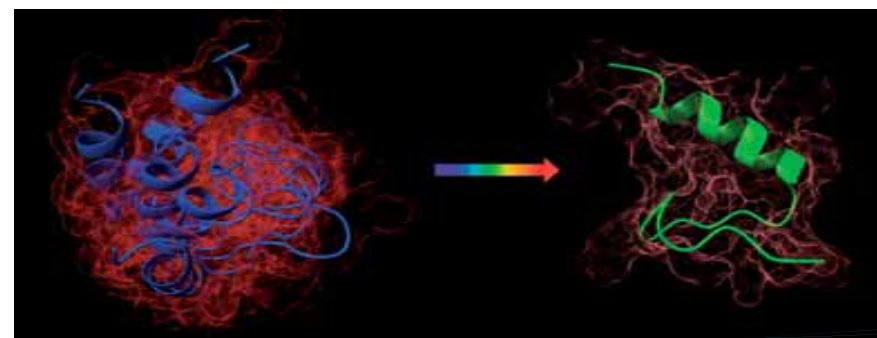
Las proteínas con plegamiento downhill podrían actuar como reostatos moleculares a nivel celular, funcionando como sensores, osciladores de sincronización, y/o muelles ajustables. Estamos investigando esta hipótesis en el complejo multienzimático de la oxo-glutarato deshidrogenasa, para el cual hemos demostrado teóricamente la viabilidad del mecanismo oscilador, usando experimentos de moléculas únicas por FRET y microscopía de fuerza atómica.

Predicción de Estructura y Diseño de Proteínas

Los abordajes tradicionales de predicción-diseño se restringen a calcular la energía de cada conformación. Nuestra alternativa es calcular superficies de baja dimensionalidad para la energía libre de plegamiento de cada conformación diana, con lo que podemos también estimar rápidamente su estabilidad global y cinética de plegamiento. Este método lo hemos refinado usando datos experimentales de plegamiento, y en el futuro planeamos aplicarlo a predicción y diseño *de novo* de proteínas.

Mecanismos Moleculares de la Apoptosis

Para estudiar los mecanismos apoptóticos a nivel molecular-atómico y su conexión con el cáncer y las enfermedades autoinmunes utilizamos RMN y otras técnicas estructurales-biofísicas. Nuestros resultados más recientes en esta área han sido la determinación de la estructura tridimensional de la proteína apoptótica ASC humana, la cual nos descubre el mecanismo molecular de las interacciones proteína-proteína dentro de la superfamilia de los "Death Domain".



Experimental Studies of Protein Folding

We have shown that proteins fold over small barriers and even downhill, opening new avenues in biophysics research. We are exploiting these findings by studying a catalogue of basic folding patterns or "archetypes" using NMR, ultrafast kinetic techniques, single molecule and computational approaches. In addition we are developing new analytical tools to investigate folding.

Downhill Folding and Molecular Rheostats

Downhill folding proteins could act as molecular rheostats in the cell, serving as sensors, oscillators that synchronize multistep reactions and adjustable springs. To test this hypothesis, we study the oxo-glutarate dehydrogenase multienzyme complex, which we recently showed could theoretically act as an oscillator mechanism through single molecule FRET and atomic force microscopy studies.

Structure Prediction and *de novo* Design

Classical approaches to predict structure and for design rely solely on energy calculated through approximate force-fields. However, we calculate low-resolution folding free energy surfaces for each target conformation, which allows us to quickly estimate global stability and foldability. We are now testing this method against experimental protein folding rates and stabilities, and we plan to apply it to *ab initio* structure prediction and *de novo* design.

Molecular Mechanisms of Apoptosis

Cell death is implicated in cancer and autoimmune disorders. We study apoptosis mechanisms at the molecular-atomic level by NMR and with other structural techniques to understand their connection with disease. More recently, we determined the 3D structure of the human ASC protein, a Death Domain superfamily member implicated in apoptosis and inflammation, revealing its protein-protein binding mechanism.

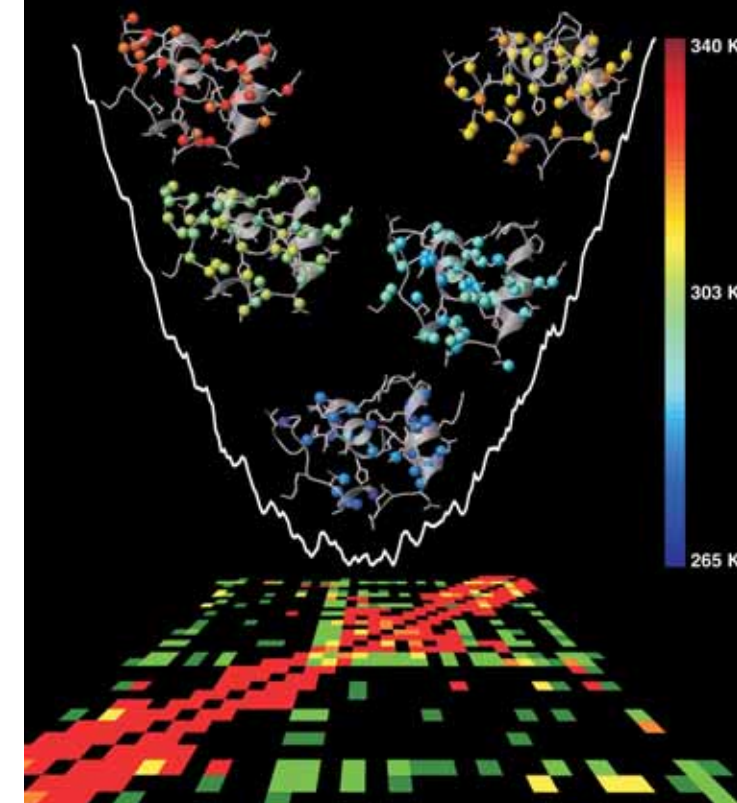


Fig. 2. Análisis átomo por átomo del plegamiento de proteínas tipo "downhill". La superficie de energía libre con un solo mínimo característica de proteínas "downhill" resulta en un proceso de desplegamiento gradual que ha sido estudiado a resolución atómica por RMN (parte superior). Los resultados de estos experimentos llevan a obtener la matriz de interacciones entre residuos que estabilizan la estructura nativa de la proteína (parte inferior).

Atom by atom analysis of downhill protein folding. The single well free energy surface characteristic of downhill proteins results in gradual unfolding that was studied at atomic resolution using NMR (top). From these results it is possible to obtain the residue-residue interaction matrix that stabilizes the native protein structure (bottom).



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Li, P., Oliva, F.Y., Naganathan, A.N., and Muñoz, V. (2009). Dynamics of one-state downhill protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 103-108.

Fung, A., Li, P., Godoy-Ruiz, R., Sanchez-Ruiz, J.M., and Muñoz, V. (2008). Expanding the realm of ultrafast protein folding: gpW, a mid-size natural single-domain with $\alpha\beta$ topology that folds downhill. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7489-7495.

Muñoz, V. (2007). Conformational ensembles and dynamics in protein folding. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 395-412.

Naganathan, A.N., Doshi, U., and Muñoz, V. (2007). Protein folding kinetics: barrier effects in chemical and thermal denaturation experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5673-5682.

Sadqi, M., Fushman, D., and Muñoz, V. (2007). Structural biology - Analysis of protein folding cooperativity. *Nature* 445, E17-E18.

Ver más en:
<http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=63>.



José Manuel Andreu Morales
 Profesor de Investigación
 j.m.andreu@cib.csic.es

PhD, 1976.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Científico visitante, 1976.
 MPI Freiburg, Alemania.
 Postdoctoral, 1978-1981.
 Brandeis University, Waltham MA, USA.
 Científico Titular, 1981, Jefe de Grupo CIB, 1983 y
 Profesor de Investigación, 1993.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Sonia Huecas Gayo
- Antonio Javier Martín-Galiano
- Marta Cabezas Ruiz
- David Juan Rodríguez
- Laura Ruiz Ávila
- Claudia Schaffner-Barbero

Reconocimiento y Ensamblaje Biomolecular
 Biomolecular Recognition and Assembly

Tubulinas y FtsZ
 Tubulins and FtsZ

La mayoría de las células utiliza proteínas de la superfamilia de tubulina-FtsZ para segregar sus cromosomas o dividirse. Estas GTPasas citoesqueléticas incluyen la alfabeta-tubulina de los microtúbulos, gamma-tubulina, la proteína de división celular FtsZ, la tubulina bacteriana BtubA/B y las TubZs recientemente descubiertas. Los microtúbulos forman el huso mitótico, una diana habitual de fármacos antitumorales. FtsZ es posiblemente el motor de constricción del divisoma procariótico y una diana atractiva para nuevos antibacterianos.

Most living cells use proteins from the tubulin-FtsZ superfamily of cytoskeletal GTPases for chromosome segregation or cytokinesis. These include microtubule alphabeta-tubulin, gamma-tubulin, the cell division protein FtsZ, bacterial tubulin BtubA/B and the recently discovered TubZs. Microtubules form the mitotic spindle, a current target of anticancer drugs. FtsZ directs the assembly of the prokaryotic divisome and it is possibly the constriction motor of the cytokinetic ring, as well as constituting an attractive target for new antibacterial agents.

Tubulinas y FtsZ como máquinas de ensamblaje. Búsqueda de nuevos antibióticos.
 Estudiamos la evolución y el ensamblaje de las tubulinas y FtsZ, la activación de FtsZ regulada por nucleotido y la dinámica de sus polímeros, mediante un abordaje multidisciplinar, con el objetivo de encontrar pequeñas moléculas que puedan inhibir selectivamente FtsZ y la división celular de bacterias patógenas.

FtsZ y tubulina comparten la misma estructura terciaria y ensamblan formando protofilamentos semejantes que se asocian diferentemente formando el anillo-Z ó los microtúbulos. FtsZ pliega espontáneamente, mientras que tubulina necesita la chaperonina eucariótica CCT, a la que se une por varios de sus bucles funcionales que participan en las interacciones laterales de los microtúbulos. La tubulina bacteriana BtubA/B fue posiblemente adquirida por transferencia horizontal y es mas susceptible de ingeniería de proteínas que la tubulina eucariótica. FtsZ es una máquina de ensamblaje sencilla, capaz de formar cooperativamente filamentos de una sola banda. A diferencia de otras GTPasas, los interruptores funcionales de FtsZ y tubulina se activan por los propios contactos en sus polímeros. La unión de GTP reduce la barrera energética entre los estados basal y activado, mientras que GDP provoca desensamblaje. La velocidad de intercambio del nucleotido se reduce en los polímeros de FtsZ, que probablemente ciclan con la hidrólisis de GTP. Varios análogos de GTP inhiben selectivamente el ensamblaje de FtsZ purificada pero nó el de microtúbulos. Investigamos la posibilidad de bloquear selectivamente FtsZ y la división celular bacteriana con cabezas de serie químicamente diferentes.



The tubulin/FtsZ superfamily of assembling GTPases

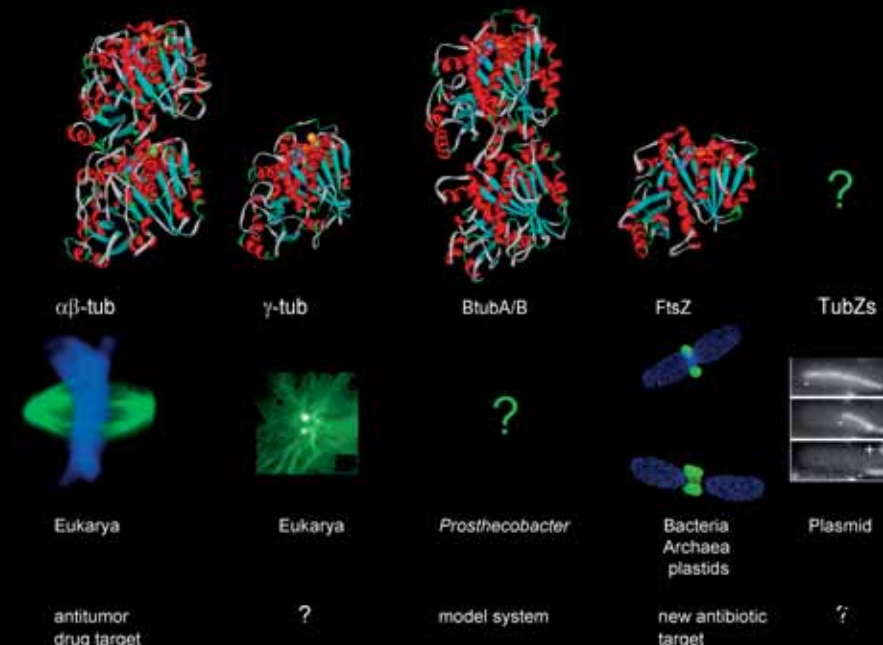


Fig. 1. Las proteínas de la superfamilia tubulina/FtsZ: estructuras, funciones conocidas, organismos donde se encuentran y sus aplicaciones.
 The tubulin/FtsZ protein superfamily: structures, known functions, sources, applications.

Understanding tubulin and FtsZ assembly machines. Seeking new antibiotics. We study the evolution and assembly of tubulins and FtsZ, the nucleotide-regulated activation of FtsZ and the dynamics of its polymers. We employ biochemical, biophysical, molecular microbiology and bioinformatics approaches to find new small molecule leads that specifically block FtsZ and which may inhibit cell division of bacterial pathogens.

FtsZ and tubulin share the same structural fold, and assemble forming similar protofilaments that associate into the Z-ring or microtubules, respectively. Although FtsZ folds spontaneously, tubulin requires the aid of the eukaryotic chaperonin CCT. Indeed, several tubulin surface loops that are shorter in FtsZ mediate its binding to CCT, as well as lateral interactions in microtubules. Bacterial tubulin BtubA/B is a much closer homologue of alphabeta-tubulin, possibly acquired by horizontal transfer from a eukaryotic host, and it folds without CCT, constituting a model system amenable to protein engineering. FtsZ is a simple self-switching machine capable of assembling co-operatively into single-stranded filaments. Unlike other GTPases, the activation switch of FtsZ and tubulin is triggered by polymer contacts, and while GTP binding only lowers the unfavourable energy difference between the ground and activated state, GDP induces disassembly. The nucleotide becomes slowly exchangeable in FtsZ polymers, which probably cycle with GTP hydrolysis. C8-substituted GTP analogues offer a proof of concept for the selective inhibition of purified FtsZ without inhibiting microtubule assembly. We are therefore studying chemically diverse leads that target FtsZ to selective block bacterial cell division.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

- Huecas, S., Llorca, O., Boskovic, J., Martín-Benito, J., Valpuesta, J.M., and Andreu, J.M. (2008). Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys. J.* 94, 1798-1806.
- Lappchen, T., Pinas, V.A., Hartog, A.F., Goomen, G.J., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J.M., Trambaiolo, D., Löwe, J., Juhem, A., Popov, A.V., and den Blaauwen, T. (2008). Probing FtsZ and tubulin with C-8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chemistry & Biology* 15, 189-199.
- Huecas, S., Schaffner-Barbero, C., Garcia, W., Yébenes, H., Palacios, J.M., Díaz, J.F., Menéndez, M., and Andreu, J.M. (2007). The interactions of cell division protein FtsZ with guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 288, 37515-37528.
- Bertrand, S., Barthelemy, I., Oliva, M.A., Carrascosa, J.L., Andreu, J.M., and Valpuesta, J.M. (2005). Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation. *J. Mol. Biol.*, 346, 319-330.
- Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M., and Löwe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9170-9175.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/tubulinas>

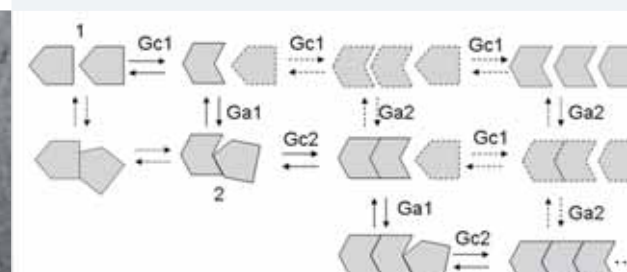


Fig. 2. Izquierda: filamentos de FtsZ purificada de *Escherichia coli* en una imagen de criomicroscopía electrónica. Derecha: esquema de mecanismo de ensamblaje autocatalítico del filamento de FtsZ.
 Left: Cryo-electron micrograph of vitrified polymers of FtsZ from *Escherichia coli*. Right: mechanism of the self-switching assembly of the FtsZ filament.

Agentes Estabilizantes de Microtúbulos Microtubule Stabilizing Agents

A pesar del número creciente de nuevos compuestos antitumorales el resultado clínico de la quimioterapia no es todavía satisfactorio. La principal razón es la aparición de la resistencia múltiple a drogas. Trabajamos en este problema en colaboración con una red de grupos de química orgánica y búsqueda de productos naturales con los siguientes objetivos: Identificar nuevos sitios farmacológicos en tubulina, encontrar nuevos compuestos cabeza de serie para los sitios conocidos y optimizar las propiedades de los compuestos conocidos cuya diana es tubulina.

Although there are a growing number of compounds that act against tumours, chemotherapy still has unsatisfactory clinical results. This is mainly due to the appearance of so-called multiple drug resistance. To address this problem, we collaborate with a network of organic chemistry and natural product groups to identify new target sites in tubulin, with the aim of finding new lead compounds for the known sites and to optimize the properties of known compounds.

Pretendemos entender los mecanismos bioquímicos y biológicos que usan los moduladores de tubulina para regular el estado de activación de la tubulina con la intención de conocer como diseñar moduladores de tubulina con mejores propiedades bioquímicas y biológicas. Nuestro objetivo es hallar o diseñar compuestos y/o estrategias que nos permitan vencer la resistencia a fármacos que los tumores desarrollan contra las drogas antitumorales usadas en clínica. Para ello estamos trabajando en tres líneas concretas.

Optimización de drogas: Trabajamos con una amplia biblioteca de compuestos para hallar las características químicas que mejoran la unión de los compuestos a sus diana y su citotoxicidad para distintos grupos de agentes antitumorales, taxanos, epotilonas, discodermolidos, dictiostatinas, laulimalidas y pelorusidos. La combinación de las características químicas que mejoran la unión y la

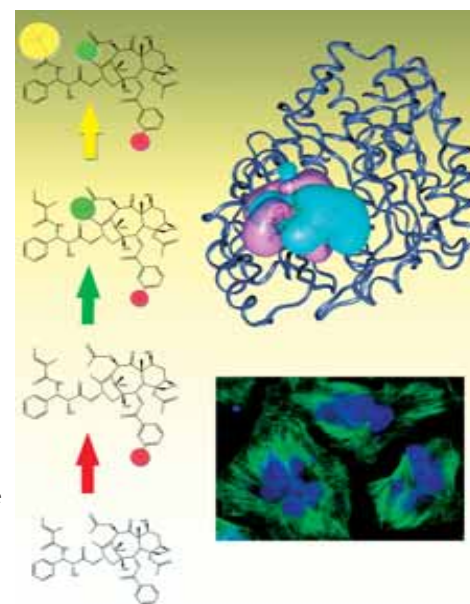


Fig. 1. Diseño de un taxano de alta afinidad Chitax-40 a partir de Paclitaxel.
Design of a high affinity paclitaxel derivative, Chitax-40.

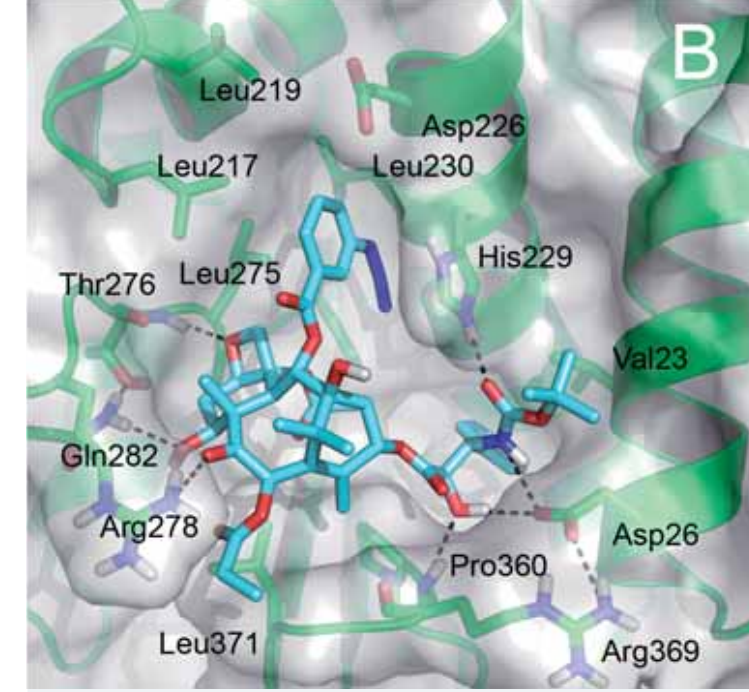
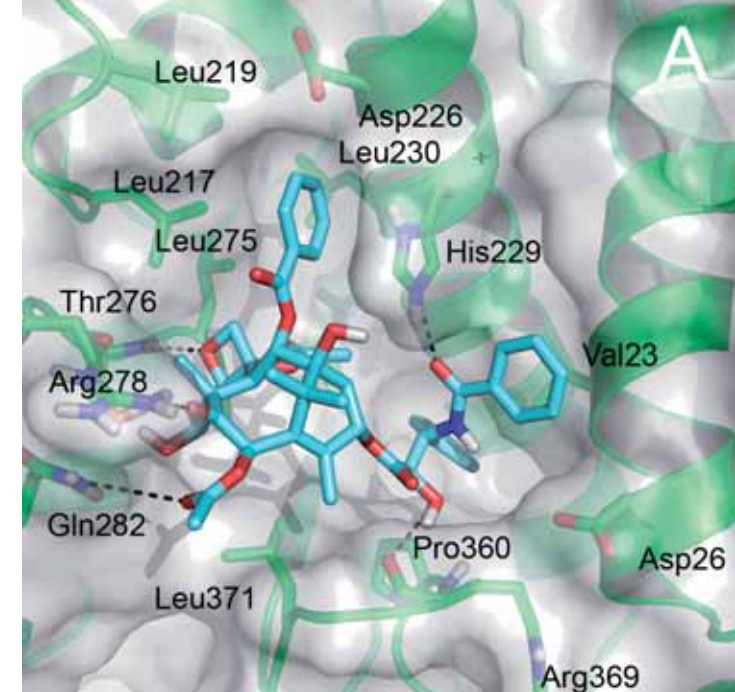


Fig. 2. Paclitaxel y su análogo optimizado Chitax-40 en su sitio de unión en β -tubulina.
Paclitaxel and its optimized analogue Chitax-40 at their binding site in β -tubulin.

citotoxicidad en una sola molécula ha permitido la síntesis de compuestos de muy alta afinidad y la capacidad de vencer la resistencia múltiple a fármacos en líneas tumorales (Buey et al 2004 Chem. Biol. 11, 225-236, Matesanz et al 2008 Chem. Biol 15, 573-585).

Búsqueda de drogas. Evaluamos las propiedades moduladoras de microtúbulos de nuevos compuestos. Esta línea ha llevado al descubrimiento de dos nuevos sitios en tubulina en los últimos años. (Pryor et al., 2002 Biochemistry 41, 9109-9115, Gaitanos et al., 2004 Cancer Research, 64, 5063-5067, Buet et al., 2007, Nature Chem. Biol. 3, 117-125).

Mecanismos de acción de agentes estabilizantes de microtúbulos: Estudiamos la manera en que los agentes estabilizantes de microtúbulos se unen a sus sitios de tubulina, lo que incluye los residuos y rutas empleados y sus conformaciones bioactivas. (Díaz et al 2005. Biol. Chem. 280, 3928-3937, Canales et al 2008 Chem. Eur. J. 14, 7557-7569).

We aim to understand the biochemical and biological mechanisms that tubulin modulators use to regulate the activation state of tubulin in order to help design tubulin modulators with better biochemical and biological properties. The main goal of these studies is to find and/or design compounds and/or strategies to overcome the resistance developed against clinically relevant antitumoural drugs. At present, we are actively working along three research lines.

Drug optimization: We work with a large library of compounds in order to find the chemical characteristics that improve the binding and cytotoxicity of compounds belonging to several groups of microtubule stabilizing agents, which include taxanes, epothilones, discodermolides, dictiostatines, laulimalides and pelorusides. The combination of chemical characteristics that improve the binding and cytotoxic properties of a group within a single molecule has led to the synthesis of compounds with high affinity and the capacity of overcome MDR (Buey et al 2004 Chem. Biol. 11, 225-236, Matesanz et al 2008 Chem. Biol 15, 573-585).

Drug discovery: We evaluate the microtubule modulating properties of new compounds, which has led to the discovery of two new binding sites in tubulin in recent years (Pryor et al., 2002 Biochemistry 41, 9109-9115, Gaitanos et al., 2004 Cancer Research, 64, 5063-5067, Buet et al., 2007, Nature Chem. Biol. 3, 117-125).

Mechanisms of action of microtubule stabilizing agents: We study the way that microtubule stabilizing agents bind to their sites in tubulin, including the pathways and residues implied in the binding process, and their bioactive conformations (Díaz et al 2005. Biol. Chem. 280, 3928-3937, Canales et al 2008 Chem. Eur. J. 14, 7557-7569).



Pablo Chacón Montes
Científico Titular
pablo@cib.csic.es

PhD, 1999.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, 2000-2003.
The Scripps Research Institute, La Jolla CA, USA
Científico Titular, 2007.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Isabel Barasoain Blasco

Otros Miembros | Other lab Members:

José Ignacio Garzón Cañas
José Ramón López-Blanco
Ruth Matesanz Rodríguez
Benet Pera Gresely
Chiara Trígili



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Canales, A., Matesanz, R., Gardner, N.M., Andreu, J.M., Paterson, I., Díaz, J.F., and Jiménez-Barbero, J. (2008). The bound conformation of microtubule-stabilizing agents (II): NMR insights on the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. **Chem. Eur. J.** 14, 7557-7569.

Matesanz, R., Barasoain, I., Yang, C., Wang, L., Li, X., de Inés, C., Coderch, C., Gago, F., Jiménez-Barbero, J., Andreu, J.M., Fang, W.S., and Díaz, J.F. (2008). Optimization of taxane binding to microtubules. Binding affinity dissection and incremental construction of a high-affinity analogue of paclitaxel. **Chem. Biol.** 15, 573-585.

Buey, R.M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M.C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D., Day, B.W., Sorensen, E.J., López, J.A., Andreu, J.M., Hamel, E., and Díaz, J.F. (2007). Cyclostin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. **Nature Chem. Biol.** 3, 117-125.

Ver más en:
http://www.cib.csic.es/es/detalle_linea_investigacion.php?dlinea_investigacion=84

Garzón, J.I., Kovacs, J., Abagyan, R., and Chacón, P. (2007). ADP_EM: Fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. **Bioinformatics** 23, 427-433.

Garzón, J.I., Kovacs, J., Abagyan, R., and Chacón, P. (2007). DFprot: A webtool for predicting local chain deformability. **Bioinformatics** 23, 901-902.

Ver más en: <http://sbg.cib.csic.es/>



Rafael Giraldo Suárez
Investigador Científico
rgiraldo@cib.csic.es

PhD, 1991.
UCM.
Postdoctoral, 1992-1994.
División de Estudios Estructurales del Laboratorio de Biología Molecular del MRC, Cambridge, Reino Unido.
Investigador Contratado, 1995-1999.
MEC.
Científico Titular, 2000-2008.
CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2008.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

M^a. Elena Fernández-Tresguerres

Otros Miembros | Other lab Members:

Fátima Gasset Rosa
María Moreno del Álamo
Ana María Serrano López

Reconocimiento y Ensamblaje Biomolecular
Biomolecular Recognition and Assembly

Ensamblajes Macromoleculares Microbianos
Microbial Macromolecular Assemblies

El trabajar con microorganismos es fascinante pues, debido a su relativa simplicidad, ellos son probablemente los primeros sistemas para los cuáles obtendremos una comprensión global de los procesos biológicos. Las macromoléculas realizan sus funciones formando parte de grandes ensamblajes. Desentrañar cómo éstos se construyen y funcionan es ahora una tarea de primordial importancia en las fronteras entre la Biología, la Física y la Química.

These are exciting times to study micro-organisms since their relative simplicity make them candidates to be the first systems in which we may obtain a global understanding of living processes. The way in which macromolecules perform their roles is by becoming part of larger assemblies. Unravelling how these complexes are built-up and function will require groundbreaking research at the frontier of Biology, Physics and Chemistry.

Durante los últimos 10 años hemos estudiado los cambios conformacionales que experimentan dominios del tipo *Winged-Helix* (WH) al unirse al ADN, lo que les faculta para iniciar la replicación de plásmidos bacterianos (proteína RepA) o de los cromosomas de levaduras (ORC, *Origin Recognition Complex*). También describimos similitudes estructurales y funcionales, de gran calado filogenético, entre RepA y los iniciadores ORC en arqueas y eucariotas. Recientemente hemos hallado un motivo en una de las subunidades de ORC que está implicado en su ensamblaje, asistido por chaperonas Hsp70. Finalmente, hemos descubierto que una secuencia de ADN reguladora específica promueve el ensamblaje del dominio RepA-WH en fibras amiloides. También hemos encontrado moléculas orgánicas que inhiben la amiloidosis de ese dominio al unirse a la superficie de reconocimiento del ADN en la proteína. Esta inducción de amiloidosis por el ADN es análoga a la descrita independientemente como responsable de la transformación estructural patológica de la proteína del prion de mamíferos (PrP^C→PrP^{Sc}). Ahora nos planteamos objetivos propios de la Biología Sintética en los que, sacando partido de nuestro conocimiento de las transformaciones estructurales inducidas por ligando en los dominios WH de RepA y ORC, pretendemos: i) el diseño de dispositivos proteicos mediante los que controlar artificialmente la replicación del ADN y el ensamblaje de proteínas en amiloides; ii) el desarrollo de *arrays* de proteínas y de biosensores microbianos para la búsqueda de moléculas inhibitoras de

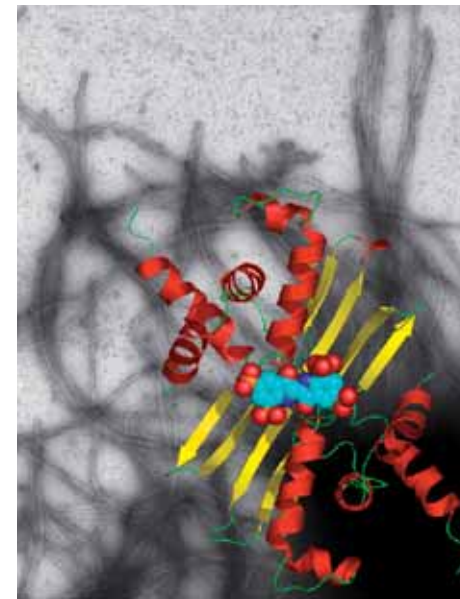


Fig. 1. Un derivado sulfonado del colorante azul índigo (esferas) reconoce el sitio de unión al ADN en la proteína RepA-WH1 (esquema de cintas rojas y amarillas), bloqueando así la polimerización de ésta en fibras amiloides (fondo, micrografía electrónica) similares a las formadas por el prion PrP.

A sulfonated derivative of indigo blue (spheres) fits at the DNA binding site in the RepA-WH1 protein (red and yellow ribbons), blocking polymerization of the protein into the amyloid fibres (electron micrograph in the background) similar to those built by the PrP prion.

ambos procesos; y iii) explorar la factibilidad de utilizarlos en la construcción de nuevos dispositivos funcionales (ortogonales) en microorganismos.

Over the last 10 years, we have studied the bases of DNA-promoted conformational changes in the *Winged-Helix* (WH) domains involved in the initiation of replication of bacterial plasmids (RepA protein) and yeast chromosomes (Origin Recognition Complex, ORC). By combining genetic, biochemical and biophysical approaches, we have characterized the large structural switch experienced by RepA to enable it to act as a replication initiator, establishing a paradigm in plasmid biology and DNA replication. We also reported evolutionarily relevant structural and functional similarities between RepA and the eukaryotic/archaeal ORC. We recently found a protein motif involved in the assembly of the subunits of the ORC component assisted by Hsp70 chaperones. Finally, we discovered that a specific regulatory DNA sequence promotes the assembly of RepA-WH into amyloid fibres. We have also found small molecules that inhibit amyloidogenesis by binding to the DNA recognition interface in the protein. DNA-induced WHs amyloidogenesis mirrors the amyloid pathogenic transformation (PrP^C→PrP^{Sc}) experienced by the mammalian prion protein upon binding to nucleic acids. We now aim to take advantage of the ligand-induced conformational switches in RepA and ORC WHs as the grounds to explore their potential in Synthetic Biology. This process will be applied to: i) the bottom-up design of protein devices to artificially control DNA replication and amyloid assembly; ii) engineer reliable protein arrays and microbial sensors for HTS of small molecule inhibitors/ effectors of both processes; and iii) explore their feasibility in building novel functional, self-assembling (orthogonal) microbial modules.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Gasset-Rosa, F., Díaz-López, T., Lurz, R., Prieto, A., Fernández-Tresguerres, M.E., and Giraldo, R., (2008). Negative regulation of pPS10 plasmid replication: Origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Mol. Microbiol.* 68, 560-572.

Gasset-Rosa, F., Maté, M.J., Dávila-Fajardo, C., Bravo, J., and Giraldo, R., (2008). Binding of sulphonated indigo derivatives to RepA-WH1 inhibits DNA-induced protein amyloidogenesis. *Nucleic Acids Res.* 36, 2249-2256.

Giraldo, R. (2007). Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 17388-17393.

Díaz-López, T., Dávila-Fajardo, C., Blaesing, F., Lillo, M.P., and Giraldo, R. (2006). Early events in the binding of the pPS10 replication protein RepA to single iteron and operator DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 364, 909-920.

Giraldo, R., Fernández-Tornero, C., Evans, P.R., Díaz-Orejas, R., and Romero, A. (2003). A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat. Struct. Biol.* 10, 565-571.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=61>



Mª Dolores Pérez-Sala Gozalo
Investigadora Científica
dperezsala@cib.csic.es

MD, 1983.
Universidad de Extremadura.
PhD, 1987.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral
Harvard University, Boston, USA.
Científica Titular, CSIC, 2000. Jefa de Grupo CIB, 2003.
Investigadora Científica, 2006.
CIB, CSIC.
Vicedirectora del CIB desde 2008.

Otros Miembros | Other lab Members:

Mónica Herrera Quintana
Francesca Bray
Mª Jesús Carrasco Soto
Beatriz Díez Dacal
Beatriz Garzón Fernández
Javier Gayarre Navarro
Clara Lillian Oeste Villavieja
Francisco Javier Sánchez Gómez

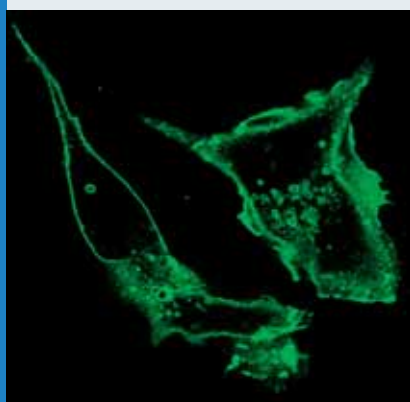


Fig. 1. Imagen de microscopía confocal de la proteína GFP-H-Ras en células endoteliales vivas. La transfección de construcciones de GFP-H-Ras en células endoteliales permite la detección de H-Ras en la membrana plasmática y en vesículas citoplásmicas mediante microscopía confocal en célula viva.

Confocal microscopy image of GFP-H-Ras in live endothelial cells. Transfection of GFP-H-Ras constructs in endothelial cells and live confocal microscopy allows the detection of H-Ras at the cell membrane and in vesicular cytoplasmic structures.

Reconocimiento y Ensamblaje Biomolecular
Biomolecular Recognition and Assembly

Modificación Postraduccional de Proteínas
Protein Posttranslational Modifications

La modificación postraduccional de proteínas es un mecanismo básico para la regulación de su estructura y actividad por numerosos mediadores endógenos, toxinas y fármacos. Nuestro grupo estudia la modificación de proteínas por lípidos y especies reactivas, tanto su importancia fisiológica, como su papel en el mecanismo de acción de fármacos. Nuestro trabajo aborda la caracterización estructural y funcional de nuevos tipos de modificación postraduccional, la identificación de sus proteínas dianas y sus repercusiones fisiopatológicas en el contexto de procesos inflamatorios y oncogénicos.

Protein posttranslational modifications are key mechanisms in the regulation of protein structure and function in response to endogenous modulators, toxins and therapeutic agents. Our group studies the modification of proteins by lipids and reactive species, their physiological importance and their implication in the mechanisms of drug action. We attempt to structurally and functionally characterize novel types of posttranslational modifications, identifying their protein targets and their pathophysiological consequences in the context of inflammation and tumorigenesis.



Las modificaciones postraduccionales de residuos de cisteína en proteínas por lípidos juegan un importante papel en los mecanismos de regulación celular y en la acción de ciertos fármacos. Las estatinas ejercen algunos de sus efectos beneficiosos mediante la inhibición de la isoprenilación de las proteínas Rho. El estudio detallado de esta inhibición ha permitido la identificación de nuevas funciones de la isoprenilación y sus modificaciones asociadas en la localización y degradación de la proteína RhoB, mediante mecanismos que pueden ser aplicados para inducir la degradación de proteínas quiméricas.

Hemos estudiado también la modificación de residuos de cisteína por lípidos electrófilos endógenos, que se generan por oxidación o deshidratación de lípidos insaturados. En concreto hemos estudiado la modificación de proteínas por prostaglandinas con estructura ciclopentenona (cyPG), que son eicosanoides electrófilos con acciones antiinflamatorias y

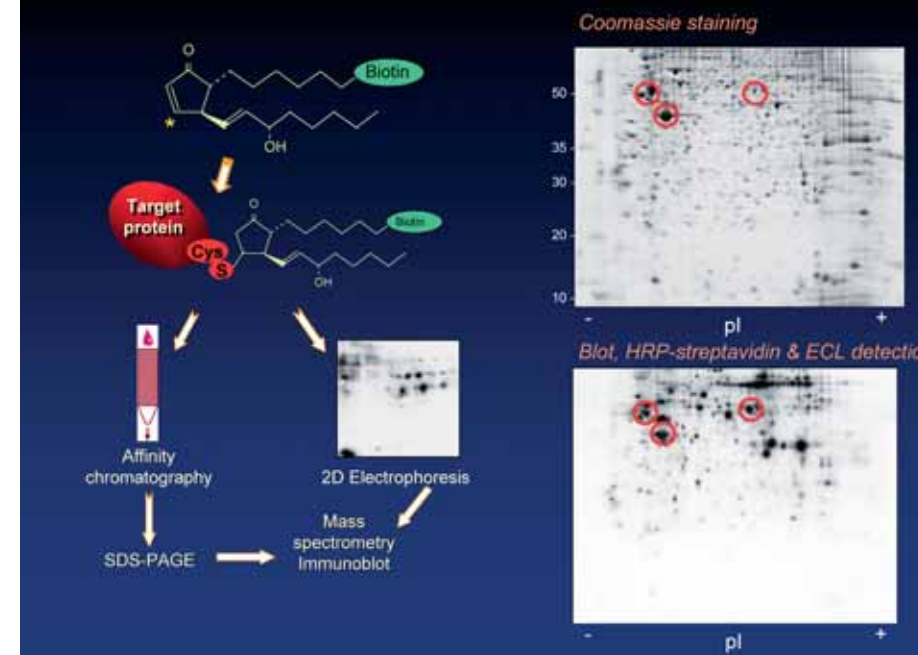


Fig. 2. Strategy for the identification of novel targets for modification by biotinylated PGA₁. Cyclopentenone prostaglandins, like PGA₁, bind covalently to cysteine residues in proteins and elicit anti-inflammatory and anti-tumoral effects. By using biotinylated analogs, proteomic approaches can be set up to identify protein targets involved in the biological effects of PGA₁. Among these, affinity chromatography and mono or bi-dimensional gel electrophoresis can be combined with mass spectrometry for target identification.

Strategy for the identification of novel targets for modification by biotinylated PGA₁. Cyclopentenone prostaglandins, like PGA₁, bind covalently to cysteine residues in proteins, and they elicit anti-inflammatory and anti-tumoral effects. By using biotinylated analogues, protein targets involved in the biological effects of PGA₁ can be identified by proteomic approaches. Among these, affinity chromatography and mono or bi-dimensional gel electrophoresis can be combined with mass spectrometry for target identification.

antiproliferativas. Hemos descrito la unión de las cyPG a proteínas fisiopatológicamente relevantes, como la subunidad p50 del factor de transcripción NF-κB y hemos demostrado el papel esencial de la modificación covalente de proteínas en los efectos antiinflamatorios de estos compuestos. Además hemos puesto a punto abordajes proteómicos para identificar nuevas dianas de esta modificación, entre las cuales hemos encontrado c-Jun, las proteínas Ras, enzimas como GST y proteínas estructurales como actina y vimentina, cuya modificación parece estar implicada en los efectos de las cyPG sobre el citoesqueleto. Resultados recientes de nuestro grupo indican que la modificación de proteínas por eicosanoides reactivos es selectiva y depende de la estructura de la proteína y de la cyPG, lo cual proporciona nuevas perspectivas para el desarrollo de fármacos.

We study the posttranslational modification of cysteine residues in proteins by lipid moieties, and its role in cell regulation and in the mechanisms of drug action. Some of the beneficial effects of statins on cardiovascular function are mediated by the inhibition of isoprenylation of Rho proteins. The detailed study of this inhibition resulted in the identification of novel functions of isoprenylation and associated modifications in RhoB degradation and targeting, through mechanisms that can be exploited to induce the degradation of chimeric proteins.

We have also addressed the modification of cysteine residues by endogenous electrophilic lipids generated by oxidation or dehydration of unsaturated lipids. We have studied the modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins (cyPG), electrophilic eicosanoids that display anti-inflammatory and anti-proliferative effects. We reported the addition of cyPG to pathophysiologically relevant proteins, such as the p50 subunit of the NF-κB transcription factor, and we established the key role of covalent protein modifications in the anti-inflammatory effects of cyPG. We also identified new targets for this modification through proteomic approaches, including c-Jun, Ras proteins, detoxifying enzymes like GST and structural proteins, like actin and vimentin, the modification of which may be involved in the effects of electrophilic lipids on the cytoskeleton. Our recent results show that protein modification by reactive eicosanoids is selective, depending on the structure of the protein and of the cyPG, opening new perspectives for drug design.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

- Delgado, M., Pérez-Miguelsanz, J., Garrido, F., Rodríguez-Tarduch, G., Pérez-Sala, D., and Pajares, M.A. (2008). Early effects of copper accumulation on methionine metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2080-2090.
- Pérez-Sala, D. (2007). Protein isoprenylation in biology and disease: general overview and perspectives from studies with genetically engineered animals. *Front. Biosci.* 12, 4456-4472.
- Gharbi, S., Garzón, B., Gayarre, J., Timms, J., and Pérez-Sala, D. (2007). Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J. Mass Spectrom.* 42, 1474-1484.
- Renedo, M., Gayarre, J., García-Domínguez, C.A., Pérez-Rodríguez, A., Prieto, A., Cañada, F.J., Rojas, J.M., and Pérez-Sala, D. (2007). Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* 46, 6607-6616.
- Sánchez-Gómez, F.J., Gayarre, J., Avellano, M.I., and Pérez-Sala, D. (2007). Direct evidence for the covalent modification of glutathione-S-transferase P1-1 by electrophilic prostaglandins: implications for enzyme inactivation and cell survival. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 150-159.

Ver más en: http://www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=38



Patentes | Patents

Pérez-Sala, D., Boya, P., Stamatakis, K.

Fecha de prioridad: 2008.
Uso de una secuencia proteica de localización y degradación endolisosomal.
Número de solicitud Nacional: P200802721.



Germán A. Rivas Caballero
Investigador Científico
grivas@cib.csic.es

Ph.D. en Ciencias Químicas, 1989.
Universidad Autónoma de Madrid.
Posdoctoral, 1990-1992.
NIH, Bethesda, USA.
Posdoctoral, 1993.
Biozentrum, Universidad Basilea, Suiza.
Investigador contratado, 1994.
CIB, CSIC.
Científico Titular del CSIC, 1995.
CIB, CSIC.
Jefe de grupo en el CIB, 1996.
CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2006.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Mercedes Jiménez Sarmiento

Otros Miembros | Other lab Members:

María del Carmen Fernández Alonso
Estefanía Salvarelli Martín
Rubén Ahijado Guzmán
Pilar López Navajas
Ariadna Martos Sánchez

Interacciones Macromoleculares: Energética y Dinámica

Macromolecular Interactions: Energetics and Dynamics

Nuestro grupo está interesado en la caracterización biofísica cuantitativa de interacciones macromoleculares reversibles en disolución y sobre superficies. En la actualidad nos centramos específicamente en las interacciones que dan lugar a la formación de complejos implicados en la división celular bacteriana, que estudiamos en condiciones físico-químicas controladas que simulen los ambientes fisiológicos en los que estos complejos se localizan y han evolucionado para funcionar.

Our group is interested in the quantitative biophysical characterization of reversible macromolecular interactions in solution and on surfaces. Present research focuses specifically on interactions leading to the formation of complexes involved in bacterial cell division, which we study under controlled physicochemical conditions that mimic the physiological environments in which these complexes are located and have evolved to function.



Biología sintética de la división celular bacteriana: Estudios biofísicos y reconstitución del proto-anillo bacteriano en disolución y en sistemas de membrana. Estos estudios forman parte de los objetivos de los programas de investigación COMBACT-CM y DIVINOCELL, coordinados por Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid), que pretenden reconstruir un ensamblaje funcional que reproduzca en el tubo de ensayo las etapas iniciales de la división bacteriana. Los componentes de la maquinaria de división ensamblan de manera concertada para formar un anillo dinámico en el medio de la célula hacia el final del ciclo celular. En *E. coli* el primer complejo multi-proteico que se forma es el proto-anillo, que está constituido por tres proteínas (FtsZ, FtsA, ZipA) que ensamblan en la membrana citoplásmica, proceso que inicia la división. Estos proyectos proporcionarán herramientas para la identificación de sustancias que puedan modular/interferir con interacciones proteína-proteína esenciales en división y que potencialmente puedan dar lugar a nuevos antibióticos.

Bioquímica y biofísica citomimética: Investigación de los efectos de la aglomeración macromolecular y la adsorción superficial en biomembranas sobre la formación de complejos multi-proteicos esenciales: energética, dinámica y organización estructural de los complejos en fluidos y nano-contenedores que mimeticen el ambiente fisiológico (Allen Minton, NIH, Marisela Vélez, ICP-CSIC, y Francisco Monroy, UCM).

Métodos biofísicos: Caracterización cuantitativa de interacciones macromoleculares mediante técnicas de ultracentrifugación analítica y dispersión de luz. Además de estudiar proteínas de división bacteriana, durante este bienio hemos aplicado estas técnicas para analizar complejos proteína-proteína y proteína-DNA implicados en i) la organización del genoma del fago Ø29 (Margarita Salas, CBMSO, Madrid), ii) el catabolismo de compuestos aromáticos (Juan Luis Ramos, EEZ-CSIC, Granada), y iii) la regulación de la expresión génica (Catherine Royer, Centre Biochimie Structurale, Montpellier, FR), y para estudiar complejos multiproteicos de proteínas del complemento con interés biomédico (Santiago Rodríguez de Córdoba, CIB).



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Alcorlo, M., Jiménez, M., Ortega, A., Minton, A.P., Hermoso, J.M., Salas, M., and Rivas, G. (2008). Analytical ultracentrifugation analysis of phage Ø29 protein p6 – DNA complex formation. **J. Mol. Biol.**, (doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.044). en prensa/in press.

Jiménez, M., Rivas, G., and Minton, A.P. (2007). Quantitative characterization of weak self-association in concentrated solutions of immunoglobulin G via measurement of sedimentation equilibrium and osmotic pressure. **Biochemistry** 46, 8373-8378.

González JM, Vélez M, Jiménez M, Alfonso C, Schuck P, Mingorance J, Vicente M, Minton AP, Rivas G (2005). Cooperative behavior of Escherichia coli cell-division protein FtsZ assembly involves the preferential cyclization of long single-stranded fibrils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102:1895-1900.

Synthetic biology of bacterial cell division: Biophysical studies and reconstitution of the bacterial proto-ring in solution and in membrane systems. These studies are part of the goals of the COMBACT-CM and DIVINOCELL research programmes coordinated by Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid) that aim to reconstruct a functional assembly reproducing the initial steps of bacterial cell division in a test tube. The components of the division machinery assemble in a concerted manner to form a dynamic ring at mid-cell towards the end of the cell cycle. In *E. coli* the first multi-protein complex formed is the proto-ring, which is a complex of three proteins (FtsZ, FtsA and ZipA) that assemble at the cytoplasmic membrane and that initiates division. These projects will provide tools to identify substances that can modulate/interfere with protein-protein interactions essential to cell division, possibly acting as a novel class of antibiotics.

Cytomimetic biochemistry and biophysics: Investigation of the effects of macromolecular crowding and surface adsorption onto biomembranes in the formation of essential multi-protein complexes: energetics, dynamics and structural organization of the complexes in fluids and nano-containers that mimic the physiological environment (Allen Minton, NIH, Marisela Vélez, ICP-CSIC, and Francisco Monroy, UCM).

Biophysical methods: Quantitative characterization of macromolecular interactions via analytical ultracentrifugation and light scattering. In addition to studying proteins involved in bacterial division, we have applied these techniques to study protein-protein and protein-DNA complexes involved in: i) Ø29 phage genome organization (Margarita Salas, CBMSO, Madrid); ii) the catabolism of aromatic compounds (Juan Luis Ramos, EEZ-CSIC, Granada); and iii) regulation of gene expression (Catherine Royer, Centre Biochimie Structurale, Montpellier, FR), as well as to study complement multi-protein complexes of biomedical interest (Santiago Rodríguez de Córdoba, CIB).

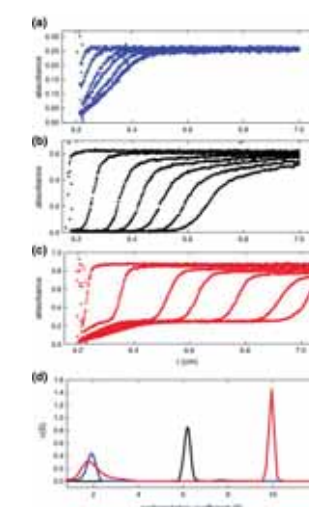


Fig. 2. Análisis de velocidad de sedimentación de la formación del complejo entre la proteína p6 de Ø29 con un fragmento de DNA (250 pb) conteniendo el terminal izquierdo de la secuencia del DNA de Ø29 (L). Perfiles de velocidad de sedimentación (a)-(c) y distribución c(s) (d) de la proteína p6 (círculos azules; (a)), L (círculos negros; (b)), y la mezcla p6-L (círculos rojos; (c)). Tomado de Alcorlo et al. (2008) *J. Mol. Biol.*, en prensa (doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.044).

Sedimentation velocity analysis of complex formation between the Ø29 protein p6 and a DNA fragment (250 bp) containing the left terminal Ø29 DNA sequence (L). Sedimentation velocity profiles (a)-(c) and c(s) distribution (d) of the p6 protein (blue circles; a), L (black circles; b), and p6-L mixture (red circles; c). Taken from Alcorlo et al. (2008) *J. Mol. Biol.*, in press (doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.044).

Reconocimiento y Ensamblaje Biomoléculas
Biomolecular Recognition and Assembly

Zhou, H.X., Rivas, G., and Minton, A.P. (2008). Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. **Annu. Rev. Biophys.** 37, 375-397.

Hörger, I., Velasco, E., Vélez, M., Rivas, G., Tarazona, P., and Vélez, M. (2008). FtsZ bacterial cytoskeletal polymers on curved surfaces: the importance of lateral interactions. **Biophys. J.** 94, L81-83.

Ver más en:
<http://www.cib.csic.es/es/grupo.grivas> <http://www.cib.csic.es/es/grupo.grivas>

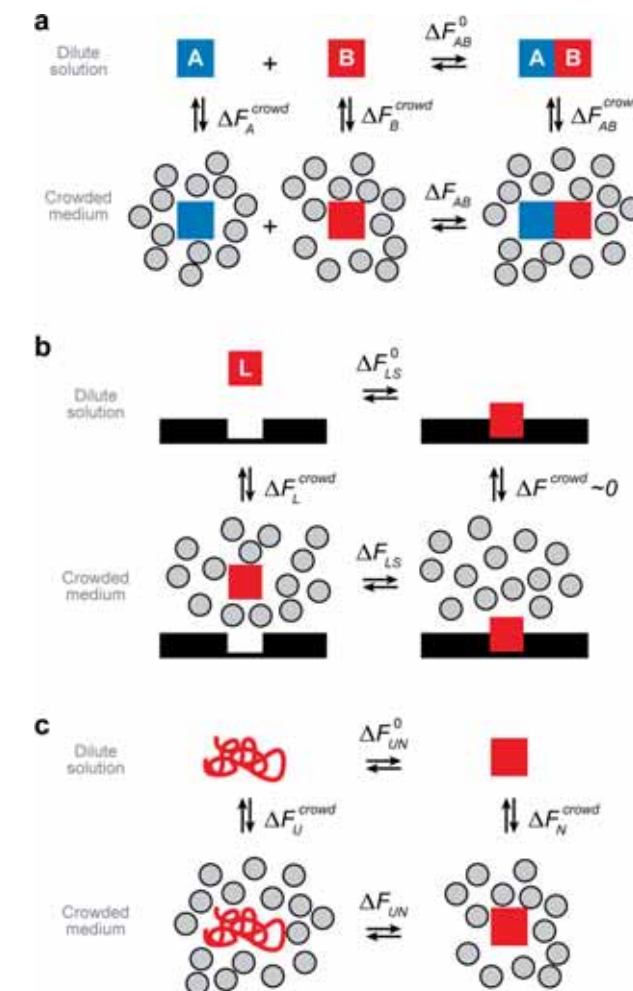


Fig. 1. Ciclos termodinámicos que ilustran los efectos de la aglomeración macromolecular sobre la energética de (a) la asociación en disolución, (b) la unión a una superficie, y (c) el plegamiento en dos estados de una proteína. Tomado de Zhou et al. (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37, 375-397.

Thermodynamic cycles illustrating the effects of crowding on the energetics of: (a) association in solution; (b) surface site-binding; and (c) the two-state folding of a protein. Taken from Zhou et al. (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37, 375-397.



Luis I. Rivas López
Investigador Científico
luis.rivas@cib.csic.es

Doctorado CC Químicas (Bioquímica), 1984.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, 1984-1986.
Weizmann Institute of Science, Yale University.
Científico Titular, 1986.
CIB, CSIC.
Jefe de grupo, 1986.
CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2006.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Eugenia Carrillo Gallego
Francisco Javier Moreno Nuncio
María Fernández Reyes Silvestre
Silvia Adelia Guallart Bolaños
Ariadna I Rojas Umanes
Juan Román Luque-Ortega

Péptidos Antibióticos Eucarióticos Eukaryotic Antibiotic Peptides

La interacción péptido-fosfolípido es aprovechada por los péptidos antimicrobianos eucarióticos para lograr la permeabilización de la membrana plasmática de un amplio rango de patógenos, ya irreversible, como etapa letal, o transitoria para acceder a dianas intracelulares, actuando como péptidos penetrantes de células. Constituyen nueva alternativa quimioterapéutica por explotar nuevas dianas con muy baja inducción de resistencia, así como herramienta nanotecnológica de vehiculización de fármacos unidos a los mismos sin requerir transportador funcional específico.

The plasma membrane of pathogens are permeated by eukaryotic antimicrobial peptides through peptide-phospholipid interactions producing either an irreversible lethal outcome, or simply gaining access to their intracellular targets as a transitory step. Hence, these peptides may provide a new alternative for chemotherapy, either by exploiting new targets with an extremely low rate of resistance, or as vehicles for a wide variety of molecules that are not associated with a dedicated transporter.

Nuestro grupo trabaja en el diseño y optimización de péptidos antibióticos (PAs) activos en membrana como nuevos agentes terapéuticos contra dos patógenos oportunistas, *Leishmania* (protozoo) y *Acinetobacter baumannii* (Gram-), cuya multiresistencia creciente supone un alto riesgo de fracaso terapéutico.

Como nuevos péptidos leishmanicidas, se han ensayado los kahalalidos membrano-activos, y se ha optimizado la de híbridos cecropina A-melitina (CMs) o gramicidina S, mediante manipulación de sus residuos de lisina o de fenilalanina, respectivamente estableciendo relaciones estructura-actividad y mejora de su índice terapéutico.

El mecanismo leishmanicida de histatina 5, un PAE de la saliva humana es diferente; inhibe la F_0F_1 -ATPasa mitocondrial. Actualmente se explora su potencial microbicida intrínseco así como péptido transportador de otros fármacos leishmanicidas.

Los CMs se han estudiado como alternativa frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a polimixina, el último antibiótico universalmente activo. Las bases moleculares de dicha resistencia han sido definidas mediante proteómica.

Se han desarrollado análogos fluorescentes de miltefosina (hexadecilfosfocolina), el primer fármaco oral contra *Leishmania* (A.U. Acuña (IQFR) y F. Amat (IQOG). Se ha demostrado una acumulación intracelular milimolar del fármaco y distribución homogénea en el parásito, apoyando un mecanismo multidiana. Dichos compuestos permiten el diagnóstico rápido de *Leishmania* resistentes a MT por incorporación deficiente, así como la detección de otros patógenos que incorporan dicha sonda. Otra línea en curso es la obtención de ratones humanizados para *Leishmania*, y el diseño de modelos de distribución en animal de fármacos mediante infección con parásitos sensores e imagen *in vivo* de los animales infectados.

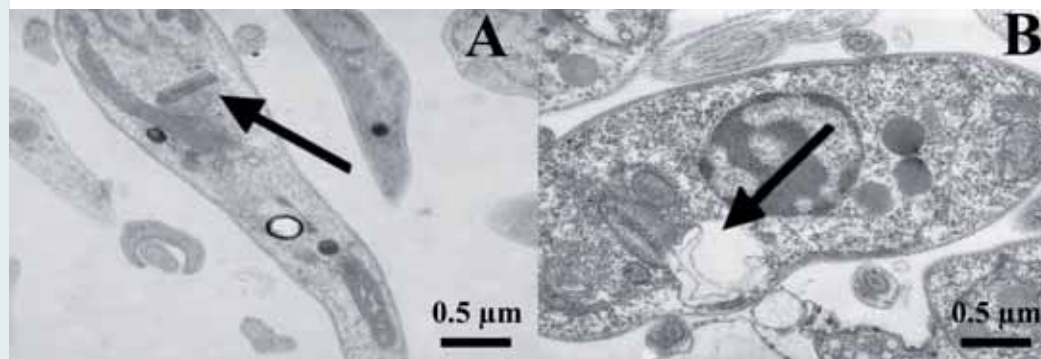


Fig. 1. Visualización del daño a la mitocondria de promastigotes de *Leishmania donovani* por el péptido antimicrobiano humano Histatina 5 (Hst5). Panel A.- Parásitos control. Panel B.- Parásitos incubados con Hst5 durante 4 h. Las flechas señalan la mitocondria del parásito.

Mitochondrial damage by the human antimicrobial peptide Histatin 5 (Hst5) to *Leishmania donovani* promastigotes. Panel A.- Control parasites. Panel B.- Promastigotes incubated for 4h with the peptide. Arrows point to the parasites mitochondria.

Biología Estructural y Cuantitativa Structural and Quantitative Biology

Our group is currently engaged in the design and optimization of a variety of membrane-active antibiotic peptides (APs) as new agents for chemotherapy against two opportunistic pathogens, *Leishmania* (Protozoan) and *Acinetobacter baumannii* (Gram-), which display ever-increasing antibiotic multiresistance.

We have defined kahalalides (Prof F. Albericio) as new membrane-active leishmanicidal peptides. In addition, the activity of other APs, such as the cecropin A-melitins hybrids (CM) and gramicidin S, have been tailored by modification of their lysine and phenylalanine residues, respectively, through SAR studies and the optimization of their therapeutic index.

By contrast, the leishmanicidal effects of the human salivary peptide histatin 5 are mostly based on the inhibition of F_0F_1 ATPase. We are currently evaluating the intrinsic leishmanicidal activity of histatin 5, as well as its potential as a vehicle for other drugs.

The CMs have been also applied as an alternative to eliminate *A. baumannii* strains resistant to polymyxin E, the latest drug universally active against these bacteria. The molecular basis of this resistance was defined by differential proteomics.

Other non-peptide related studies concern the development of fluorescent analogues of miltefosine (hexadecylphosphocholine, MT), the first oral drug that can be used against *Leishmania*. These analogues enable the intracellular MT concentration to be estimated (mM), as well as its rather homogenous intracellular distribution, indicating multitarget lethal mechanisms. Furthermore, they constitute a useful tool to detect MT-resistant parasites through defective MT uptake and the fluorescent diagnosis of other microorganisms capable of incorporating the drug. Finally, we are also attempting to obtain new animal models of *Leishmania*, including mice with humanized skin or through the *in vivo* imaging of the distribution of leishmanicidal drugs in animals infected with sensor parasites.

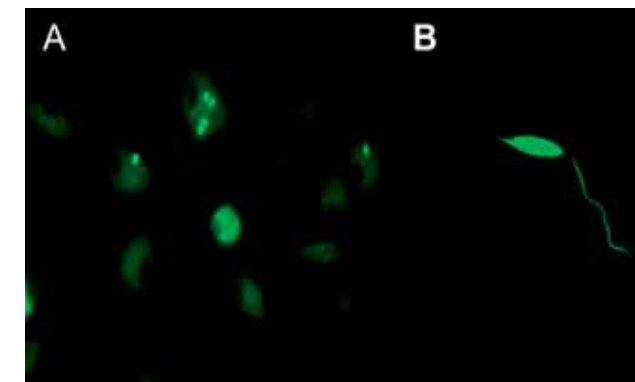


Fig. 2. Incorporación de BODIPY-Miltefosina en *Leishmania*. Panel A.- Amastigotes intracelulares de *L. pifanoi* en macrófagos peritoneales de ratón. Panel B. Promastigotes de *L. donovani*.

BODIPY-Miltefosine Uptake by *Leishmania* parasites. Panel A *L. pifanoi* intracellular amastigotes in mouse peritoneal macrophages. Panel B *L. donovani* promastigotes.



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Fernández-Reyes, M., Fernández-Falcón, M., Chiva, C., Andreu, D., and Rivas, L. (2008). The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*, a proteomic perspective. **Proteomics**. 9,1632-1645.

Luque-Ortega, J.R., van't Hof, W., Veerman, E.C., Saugar, J.M., and Rivas L. (2008). Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. **FASEB J**. 22, 1817-1828.

Luque-Ortega, J.R., and Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother**. 51, 1327-1332.

Moreno, J. (2007). Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. **Trends Parasitol**. 23, 86-88.

Saugar, J.M., Delgado, J., Hornillos, V., Luque-Ortega, J.R., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., and Rivas, L. (2007). Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. **J. Med. Chem**. 50, 5994-6003.

Ver más: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=42>



Patentes | Patents

Acuña, A.U., Amat, F., Gallego, E., Hornillos, V., Marcos, S., Requejo, J., Rivas, L., Saugar, J., del Aguila, C., and Merayo, J.
Fecha de prioridad: 2008.
Compuestos fluorescentes para diagnóstico de infecciones, procedimientos de infección y sus aplicaciones.
Número de solicitud Nacional: 200800951.

Rosa M^a
Lozano
Puerto

Científica Titular
rlozano@cib.
csic.es



PhD, 1990.
Universidad Autónoma de Madrid.
Postdoctoral
Univ. California, Berkeley, USA.
Científica Titular, CSIC, 2001. Jefa de Grupo CIB, 2008.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

M^a Ángeles Fidalgo Fernández

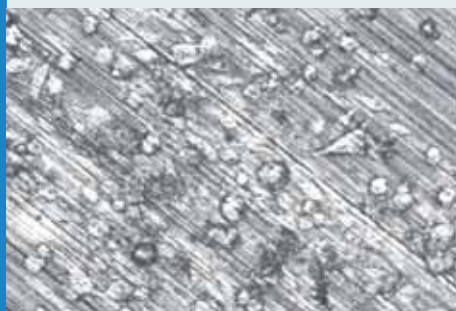


Fig. 1. Proliferación de osteoblastos humanos sobre una nueva superficie pre-tratada de una aleación de Mg. | Human osteoblast proliferation on a new pretreated Mg-alloy.



Patentes | Patents

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Lozano Puerto, R.M., Romero Garrido, A., and Valverde López, S. **Use of 2,5-dihydroxybenzene derivatives for the treatment of angiogenic diseases.** WO patent application: 2008/020031, Pub. Date: 21-02-2008, PCT/EP2007/058444.*

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Lozano Puerto, R.M., Romero Garrido, A., and Valverde López, S. **2,5-dihydroxybenzene sulfonic acid derivatives for the treatment of fibrosis.** WO patent application: 2008/020040. Pub. Date: 21-02-2008, PCT/EP2007/058454.*

Cuevas Sánchez, P., Giménez-Gallego, G., Sáenz de Tejada Gormán, I., Angulo Frutos, J., Valverde López, S., Romero Garrido, A., and Lozano Puerto, R.M. **2,5-dihydroxybenzene derivatives for the treatment dermatitis.** WO patent application: 2008/020026, Pub. Date: 21-02-2008, PCT/EP2007/058439.*

* Transferidas a Action Medicines, S.L.

Reconocimiento Célula-Biomaterial Cell-Biomaterial Recognition

El Mg y sus aleaciones se presentan como biomateriales biodegradables muy interesantes para reparación de tejido óseo debido a las siguientes propiedades que presentan: son ligeros, su módulo elástico y densidad son semejantes a los del hueso, son reabsorbibles, sus productos de corrosión no son tóxicos y son fácilmente excretados en la orina. Sin embargo, la principal limitación reside en que la velocidad de degradación de éstos es mayor que la velocidad necesaria para la regeneración del tejido.

El objetivo del laboratorio es estudiar la interacción y el proceso de reconocimiento que tiene lugar entre la célula y la superficie metálica en condiciones fisiológicas. Se pretende generar un conocimiento útil para controlar la velocidad de degradación y diseñar nuevos materiales metálicos de base Mg cuya reabsorción sea controlada y sincronizada con la regeneración del tejido óseo a reparar para una posible aplicación médica.

Se diseñarán nuevas superficies metálicas de base Mg biomiméticas por pretratamiento y funcionalización de los materiales con diferentes compuestos biocompatibles que aumenten la durabilidad, biocompatibilidad y produzcan un crecimiento celular controlado para que la reparación del tejido ocurra. La interacción célula-biomaterial se evaluará en distintos ensayos celulares y se analizará el perfil proteómico de la célula para identificar aquellas proteínas que se modifiquen como consecuencia de la interacción célula-biomaterial, y en especial ciertas implicadas en procesos tales como proliferación, apoptosis, vascularización, respuesta inflamatoria e inmune. El análisis proteómico permitirá identificar aquellas proteínas adsorbidas al biomaterial que puedan afectar a su durabilidad, estabilidad y a su deterioro en condiciones fisiológicas.

Mg and its alloys have emerged as possible biodegradable biomaterials for bone tissue repair due to the following properties: they are light, their elastic modulus and density are similar to that of bone, they are reabsorbable, their corrosion products are not toxic, and they are easily excreted in urine. However, the principal limitation is the fact that their degradation rates are greater than the rate of tissue repair.

We study the interaction and recognition processes between cell and metallic surfaces in physiological conditions with the goal of understanding how to control the rate of degradation, and to design new Mg-based metallic materials with a bioabsorption rate similar to that of the regeneration of bone tissue, and where biocompatibility is improved for potential medical applications.

New biomimetic Mg-based metallic surfaces will be designed by pre-treatment and functionalization with different biocompatible compounds to increase material durability and biocompatibility, as well as to produce controlled cell stimulation for tissue repair. Cell biomaterial interactions will be evaluated in different cellular assays and by proteomic analysis, with emphasis on proteins involved in proliferation, apoptosis, vascularisation, inflammation and immune responses. Proteomic approaches will also identify proteins adsorbed to the material surfaces that can affect biomaterial durability.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

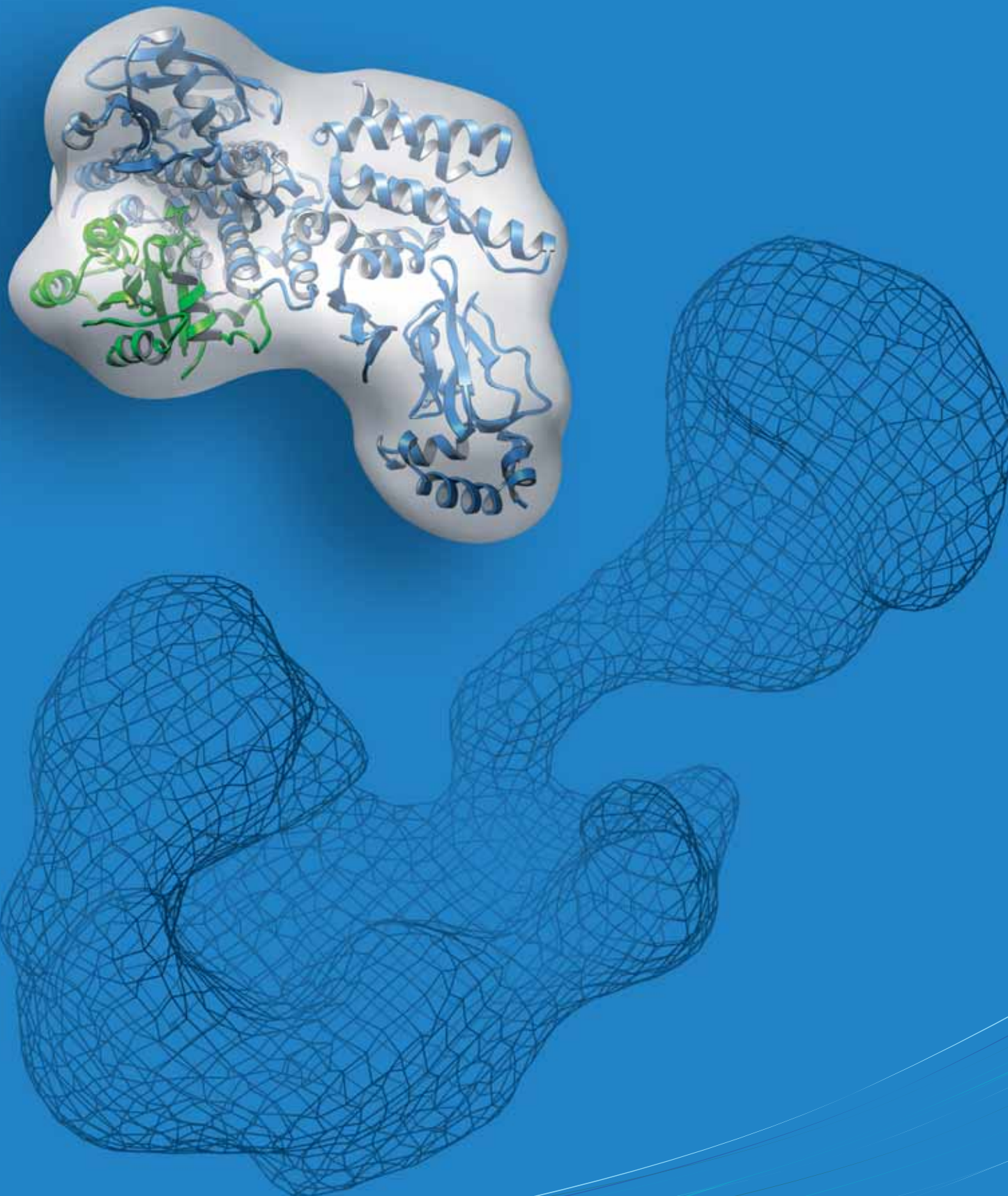
Canales-Mayordomo, A., Fayos, R., Angulo, J., Ojeda, R., Martín-Pastor, M., Nieto, P.M., Martín-Lomas, M., Lozano, R., Giménez-Gallego, G., and Jiménez-Barbero, J. (2006). Backbone dynamics of a biologically active human FGF-1 monomer, complexed to a hexasaccharide heparin-analogue, by 15N NMR relaxation methods. **J. Biomol. NMR** 35, 225-239.

Canales-Mayordomo, A., Lozano, R.M., López-Méndez, B., Angulo, J., Ojeda, R., Nieto, P., Martín-Lomas, M., Giménez-Gallego, G., and Jiménez-Barbero, J. (2006). Solution NMR structure of a human FGF-1 monomer, activated by a hexasaccharide heparin-analogue. **FEBS J.** 273, 4716-4727.

Cuevas, P., Díaz-González, D., García-Martín-Córdova, C., Sánchez, I., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Dujovny, M. (2006). Dobesilate diminishes activation of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 in glioma cells. **J. Cell. Mol. Med.** 10, 237-242.

Cuevas, P., Díaz-González, D., Sánchez, I., Lozano, R.M., Giménez-Gallego, G., and Dujovny, M. (2006). Dobesilate inhibits the activation of signal transducer and activator of transcription 3, and the expression of cyclin D1 and bcl-XL in glioma cells. **Neurol. Res.** 28, 127-130.

Fernández-Tornero, C*, Lozano, R.M*, Rivas, G., Jiménez, M.A., Ständker, L., Díaz-González, D., Forssmann, W-G., Cuevas, P., Romero, A., and Giménez-Gallego, G. (2005). Synthesis of the blood circulating C terminal fragment of IGF-binding protein-4 in its native conformation: Crystallization, heparin and IGF binding, osteogenic activity. **J. Biol. Chem.** 280, 18899-18907.



CIEM INDICE

Interacciones Planta-Medioambiente Plant-Environment Interactions

Pedro Castañera y Félix Ortego Pedro Hernández Crespo, Gema M ^a Pérez Farinós	40
José Ramón Díaz Ruíz y Francisco Tenllado	42
César Llave y Tomás Canto	44
Isabel García Luque y M ^a Teresa Serra Yoldi	46
F. Javier Medina Díaz	48
M ^a Carmen Risueño y Pilar Sánchez Testillano	50
Julio Salinas	52

Microbiología para el Desarrollo Sostenible Microbiology for Sustainable Development

José Luis García Eduardo Díaz, M ^a Auxiliadora Prieto	54
Ángel T. Martínez y M ^a Jesús Martínez Alicia M ^a Prieto, Susana Camarero	56

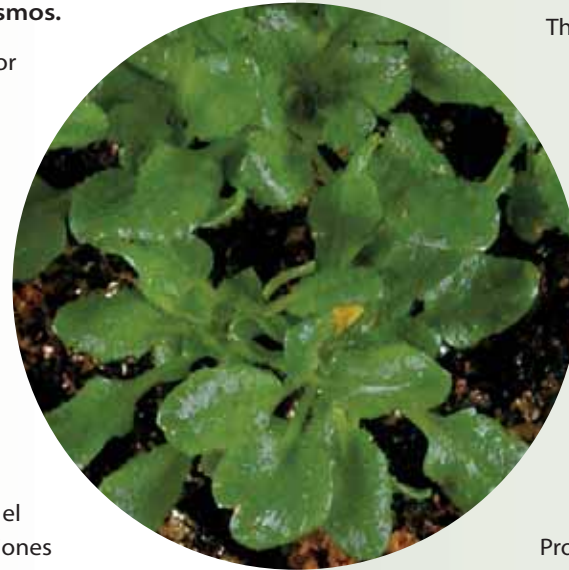


Presentación

Biología Medioambiental

El Programa de Investigación en Biología Medioambiental del CIB se ha creado con el objetivo de incrementar nuestro conocimiento en los procesos biológicos implicados en las interacciones entre el medio ambiente y algunas actividades humanas que conllevan la utilización de plantas y microorganismos.

Se trata de desarrollar procesos más eco-eficientes con un menor impacto ambiental en concordancia con el desarrollo de una bioeconomía sostenible. El Programa se crea alrededor de un grupo interdisciplinar de científicos que van a estudiar, tanto a nivel básico como aplicado, las interacciones del medio ambiente con las plantas y los microorganismos, no sólo para comprender mejor los mecanismos biológicos básicos subyacentes en estas interacciones, sino también con el objetivo de mitigar los problemas que directa o indirectamente afectan a la sostenibilidad del medio ambiente motivados por el uso intensivo de la agricultura y la producción industrial. En este Programa se combina la experiencia de los grupos de investigación participantes para desarrollar dos áreas de interés que constituyen las dos sublíneas de investigación que componen el mismo: Microbiología para un Desarrollo Sostenible e Interacciones Planta-Medio Ambiente. Por un lado, la elucidación de las bases bioquímicas y genéticas en diferentes microorganismos de interés medioambiental e industrial proporcionará el conocimiento para contrarrestar los impactos negativos de los contaminantes medioambientales y para diseñar procesos químicos más limpios. Por otro lado, el estudio de las interacciones entre las plantas y sus entornos biótico y abiótico es esencial para comprender mejor los efectos negativos que promueve el cambio climático global y disminuir su impacto negativo en la biodiversidad y los ecosistemas, así como para desarrollar nuevas estrategias para llevar a cabo una agricultura más sostenible.



Environmental Biology

Environmental Biology is a Research Programme created at the CIB to increase our understanding of the biological processes that govern the interactions between the natural environment and some human activities involving plants and/or microorganisms.

The aim is to develop more eco-efficient processes with less environmental impact within the framework of a sustainable bioeconomy, thereby helping to avoid the effects of climate change. The Programme is made up of an interdisciplinary group of scientists interested in studying the relationships between the environment and plants and/or microorganisms at both, basic and applied level. Their goal is not only to understand the fundamental underlying biological mechanisms, but also to mitigate the problems arising from agricultural and industrial production that directly or indirectly affect environment sustainability. Within the Programme, the expertise of different researches combines established and novel approaches that are essential to cope with current and future environmental changes. The Environmental Biology Programme has evolved from our original strengths in different disciplines to focus on two main areas or research sublines: Microbiology for Sustainable Development and Plant-Environment Interactions. Elucidating the biochemical and genetic principles in environmentally relevant microorganisms will provide the know-how to counteract the negative impacts of pollutants and to design cleaner chemical processes. On the other hand, understanding the interaction between plants and their biotic and abiotic environment is essential to comprehend the effects of global change and its impact on biodiversity and ecosystem functioning, as well as to develop strategies for sustainable agriculture.



Overview

Pedro Castañera
 Profesor de Investigación
 castan@cib.csic.es



M.Sc. Entomology, 1977.
 University of London, UK.
 Ph.D. Ingeniero Agrónomo, 1981.
 Universidad Politécnica de Madrid.
 Profesor de Investigación, 1989.
 (en excedencia por servicios especiales) CIB, CSIC.
 Visiting scientist, 1992-1993.
 Cornell University, Ithaca, USA.
 Vicedirector CIB, CSIC (2002-2008).
 Director General (2008-actual), INIA, MICINN.

Félix Ortego
 Investigador Científico
 ortego@cib.csic.es



Ph.D. Entomology, 1993
 University of Arizona, Tucson, USA.
 Postdoctoral, 1994-1997.
 CIB, CSIC.
 Científico Titular, 1997 y Investigador Científico, 2003.
 CIB, CSIC.
 Vicedirector CIB, CSIC desde 2008.

Investigadores del equipo | Staff Scientists:

Pedro Hernández Crespo
 Gema María Pérez Farinós

Otros Miembros | Other lab Members:

Fernando Álvarez Alfageme
 Cristina Magaña De Larriva
 César Monzó Ferrer
 Victoria San Andrés
 Rabeh Arouri
 Nuria Arranz de Pablo
 Beatriz Beroiz Remírez
 Laura Carrillo Gil
 Francisco Couso Ferrer
 Matías García García
 Ángel Luis Garvía Rodríguez
 Carolina Navas Jiménez
 María Luisa Ruiz Serra
 Natalia A. Perera González

Interacciones Planta-Medioambiente
 Plant-Environment Interactions

Interacciones Planta-Insecto
Insect-Plant Interactions

El trabajo del grupo está orientado al desarrollo de estrategias para el control de plagas que mejoren la seguridad alimentaria y la calidad ambiental. La composición del grupo nos permite realizar un abordaje multidisciplinar en el control de plagas, utilizando técnicas tanto de entomología, como de bioquímica o biología molecular. La capacidad de grupo en infraestructura y recursos humanos se ha visto favorecida por la creación de una Unidad Asociada de I+D con el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Our work is focused on the development of pest control strategies to improve food safety and environmental quality. The composition of the group allows us to adopt a multidisciplinary approach to pest control, from classical entomology to biochemistry and molecular biology. Recently, the creation of an Associated Research Unit with the "Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias" has increased the capacity of the group in terms of human resources and infrastructure.

Nuestros estudios se enmarcan en tres líneas de investigación: "El desarrollo de nuevas estrategias para el control de plagas", "La evaluación del impacto ambiental de plantas transgénicas" y "La detección y manejo de resistencia a insecticidas". Dentro de la primera, realizamos estudios sobre la fisiología digestiva de plagas de importancia económica y de insectos beneficiosos, con el objeto de optimizar la eficacia y especificidad de estrategias de control basadas en proteínas insecticidas. Asimismo, trabajamos en el desarrollo de estrategias ecológicamente aceptables para el control de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*, en cítricos, y en el diseño de bioplaguicidas basados en silenciamiento génico. Desde hace más de diez años formamos parte del Programa Nacional para la evaluación de riesgo ambiental del cultivo del maíz-Bt en España. Nuestra labor comprende el estudio del impacto del cultivo a gran escala de maíz Bt sobre insectos no diana y el seguimiento del desarrollo de resistencia a la toxina Cry1Ab; siendo uno de los laboratorios de referencia en Europa para el seguimiento de la posible aparición de resistencia en taladros del maíz. Los trabajos sobre resistencia a insecticidas pretenden sentar las bases para el desarrollo de técnicas de detección precoz de la resistencia que permitan orientar la decisión de tratamiento en campo y la selección del insecticida más apropiado. Hasta la fecha, hemos descrito el primer caso de resistencia a malatión en poblaciones de campo de *C. capitata*, determinado el mecanismo de resistencia y desarrollado un sistema de detección del alelo de resistencia.



Fig. 1. Larva del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides*, alimentándose en una mazorca de maíz.
 Larvae of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, feeding on maize cob.



Our current research is focused along three lines: "New strategies for pest control"; "Environmental risk assessment of transgenic plants"; and "Detection and management of insecticide resistance". In reference to the first of these, we study the digestive physiology of economically important insect pests and beneficial insects. Our aim is to optimize the efficacy and specificity of control strategies based on insecticidal proteins. We also work on the development of ecologically acceptable strategies to control the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, in citrus groves, as well as designing new biopesticides based on gene silencing. In the last ten years, we have participated in the Spanish National Programme for the environmental risk assessment of Bt-maize cultivation. We have evaluated the impact of commercial cultivation of Bt-maize on non-target insects, and monitored the resistance to Cry1Ab in corn borer field populations, an area in which our laboratory is considered a reference laboratory in Europe. Our work on insecticide resistance mainly aims to establish the basis to develop early detection techniques for insecticide resistance that may orientate decisions on field treatments and the selection of the most useful insecticides. Thus far, we have reported the first case of malathion resistance in field populations of *C. capitata*, as well as determining the mechanism of resistance and developing a method to detect the resistance allele.



Fig. 2. Hembra de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*, ovipositando sobre melocotón.
 Female Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, ovipositing on peach fruit.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

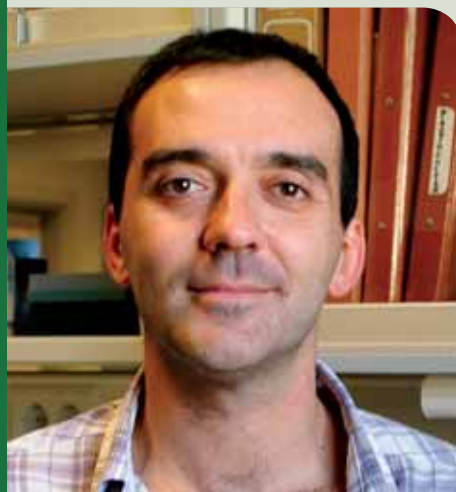
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., and Castañera, P. (2008). Diversity and seasonal phenology of aboveground arthropods in conventional and transgenic maize crops in Central Spain. *Biol. Control* 44, 362-371.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Brun-Barale, A., Couso-Ferrer, F., Bride, J.-M., Castañera, P., Feyereisen R., and Ortego, F. (2008). Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 38, 756-762.
- De la Poza, M., Farinós, G.P., Beroiz, B., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., and Castañera, P. (2008). Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) populations in the Mediterranean area. *Environ. Entomol.* 37, 1354-1360.
- Díaz-Mendoza, M., Farinós, G.P., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., and Ortego, F. (2007). Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsin from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.* 53, 428-435.
- San Andrés, V., Ortego, F., and Castañera, P. (2007). Effects of gamma-irradiation on midgut proteolytic activity of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 11-19.

Ver más en: http://www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=36



José Ramón Díaz-Ruíz
 Profesor de Investigación
 jrdiazruiz@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1971.
 Postdoctoral, Inst. Investigaciones Fitopatológicas, 1972.
 Wageningen Holanda.
 John Innes Institute, 1973.
 Norwich, UK.
 Plant Protection Institute, 1974-1976.
 Beltsville, USA.
 Investigador contratado, 1976-1978.
 Virginia Polytechnical Institute and State University,
 Blacksburg, USA.
 Científico Titular, 1979 y Profesor de Investigación, 1989.
 CIB, CSIC.



Francisco Tenllado
 Científico Titular
 tenllado@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Autónoma de Madrid, 1995.
 Postdoctoral, 1997-2000.
 Universidad Leiden, Holanda.
 Científico Titular, 2003.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Alberto García Marcos
 Remedios Pacheco Piña
 Loic Revuelta Luis
 Montserrat Llorente de Mingo

**Interacciones Planta-Medioambiente
 Plant-Environment Interactions**

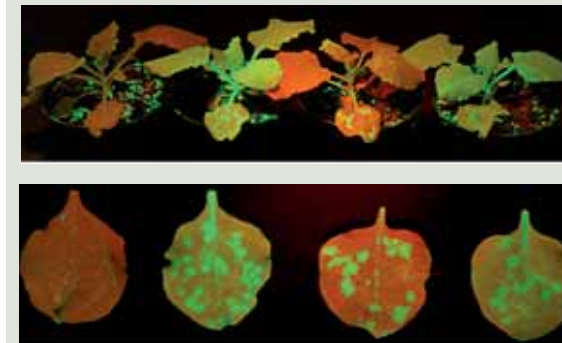
**Interacciones Moleculares
 Planta-Virus: Aproximaciones de
 Genómica Funcional y de
 Interferencia Por RNA**

**Molecular Plant-Virus Interactions:
 Functional Genomics and RNA
 Interfering Approaches**

Los virus de plantas inducen en los huéspedes susceptibles una serie de modificaciones morfológicas y fisiológicas junto a una alteración del patrón de expresión de los genes del huésped. Algunas de estas alteraciones no producen, necesariamente, una ventaja para el virus, pero pueden tener efectos adversos en el huésped. Para dilucidar los factores y procesos que determinan la enfermedad, como respuesta a los virus patógenos, estudiamos las interacciones virus-planta desde un punto de vista de genómica funcional.

In susceptible hosts, plant viruses typically induce a number of morphological and physiological modifications, as well as altering the expression pattern of host genes. Some of these alterations do not necessarily provide an advantage to the virus but nevertheless, they may have adverse effects on the host. To elucidate the factors and processes contributing to disease response to pathogenic viruses, plant-virus interactions are studied from a functional genomics perspective.

Los virus desarrollan una profunda relación con sus plantas huéspedes. La expresión de síntomas representa la suma de cambios moleculares, celulares y fisiológicos inducidos por el virus, que al menos en parte implica una respuesta del transcriptoma del huésped. Estos procesos están siendo estudiados en nuestro subgrupo utilizando herramientas moleculares, genómicas y genéticas. Actualmente, una aproximación para entender, a nivel molecular, los efectos de la infección viral sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, es definiendo las diferentes formas por las que la infección viral afecta la expresión de los genes de la planta. Los genes del huésped con perfiles de expresión alterados permiten profundizar dentro de las rutas de señalización y de los cambios bioquímicos que están



A + estradiol A - estradiol B + estradiol C + estradiol

Fig. 1. Silenciamiento génico inducible para el control de la infección por virus. Plantas de *Nicotiana benthamiana* doblemente transgénicas con locus diana y silenciador (A), plantas transgénicas con locus silenciador sólo (B), o plantas transgénicas con locus diana sólo (C), crecieron en presencia (A, C y D) o ausencia (B) del agente inductor (estradiol) y se inocularon con el virus X de la patata, portador de la proteína GFP (PVX-GFP).

Inducible gene silencing to control virus infection. Double transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing both silencer and target loci (A), transgenic plants expressing the silencer locus alone (B), transgenic plants expressing the target locus alone (C). These plants were grown in the presence (A, C and D) or absence (B) of the chemical inducer (estradiol) before inoculation with Potato virus X expressing the GFP protein (PVX-GFP).

modulados por la infección viral y que finalmente se manifiestan como síntomas. Mediante el uso de microarrays de cDNA, hemos identificado recientemente varios conjuntos de genes cuya expresión cambia como respuesta a la infección viral. Los genes alterados parecen estar distribuidos entre varias rutas metabólicas, lo que confirma que la respuesta del huésped a la infección por virus compatibles incluye una reorganización coordinada de un amplio grupo de procesos celulares, y no una simple inducción de genes involucrados en respuestas de estrés. Para identificar los genes de plantas y los circuitos celulares involucrados en la expresión de síntomas, estamos usando herramientas de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* y aproximaciones de genética inversa, basadas en silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).

Viruses develop an intimate intracellular relationship with their plant hosts and we are studying these using molecular, genomic and genetic tools. The expression of symptoms represents the sum of virus-induced molecular, cellular and physiological changes that at least partially require a host transcriptome response. Defining the different ways in which viral infection affects the expression of plant genes at the molecular level is one approach to understanding the effects

of viral infection on plant growth and development. Host genes whose expression is altered provide insight into the signalling pathways and biochemical changes that are induced by viral infection, which are ultimately manifested as symptoms. Using cDNA microarrays, we have recently identified several sets of genes that undergo changes in expression in response to viral infection. The altered genes appear to be scattered among several metabolic pathways, confirming that the host response to compatible virus infection involves a coordinated rearrangement of a wide array of cellular processes, rather than the simple induction of genes involved in stress responses. We are using *Agrobacterium*-mediated plant transformation and reverse genetics approaches based on virus-induced gene silencing (VIGS) to identify the plant genes and cellular circuits involved in the expression of symptoms.

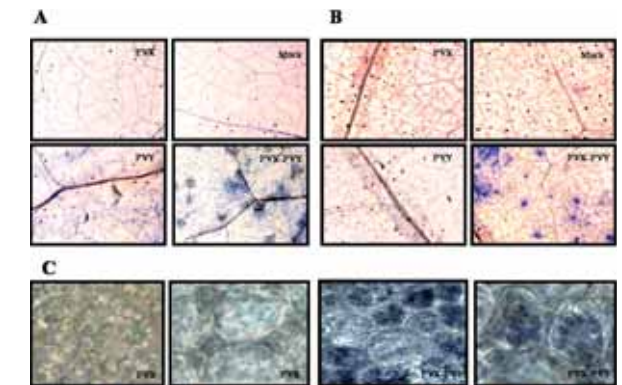


Fig. 2. Generación de O₂ y micro-necrosis en hojas sistémicas de *Nicotiana benthamiana* doblemente inoculadas con el virus X de la patata (PVX) y el virus Y de la patata (PVY) a tiempos tempranos de la infección. (A) Discos foliares de plantas inoculadas con PVX, PVY o PVX y PVY (PVX-PVY), además de plantas control, fueron teñidas con azul de tripano. Los sitios de muerte celular en la muestra PVX-PVY se visualizan por su coloración oscura. (B) Discos de hoja de plantas inoculadas con los diferentes tratamientos virales se tiñeron con solución NBT. La producción de O₂ en la muestra PVX-PVY se visualiza en las regiones con coloración azul oscura. Las imágenes fueron tomadas a 15 aumentos. (C) La producción de O₂ en la infección PVX-PVY se origina principalmente en los cloroplastos. Los discos teñidos con NBT se examinaron al microscopio a 400 aumentos.

Micro-necrosis and O₂ generation in systemic leaves of *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with both Potato virus X (PVX) and Potato virus Y (PVY) at early stages of infection. (A) Leaf discs from plants inoculated with PVX, PVY, or PVX and PVY (PVX-PVY), and mock-inoculated plants were stained with trypan blue. Cell death could be visualized as a dark colouration in the PVX-PVY sample. (B) Leaf discs from plants inoculated with the different viruses and mock-inoculated plants were stained with NBT solution. O₂ production could be visualized as dark blue colouration in the PVX-PVY sample. The images were taken at 15x magnification. (C) O₂ produced by PVX-PVY infection mostly originates from the chloroplasts. NBT-stained leaf discs were examined under a microscope at 400x magnification.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Díaz-Ruíz, J.R. (2008). 20 años de RNA: de intermediario pasivo a primer actor dinámico. *Phytoma*, 199, 68-71.

Vargas, M., Martínez-García, B., Díaz-Ruíz, J.R., and Tenllado, F. (2008). Transient expression of homologous hairpin RNA interferes with PVY transmission by aphids. *Virology J.* 5, 42.

Tenllado, F., Llave, C., and Díaz-Ruíz, J.R. (2007). Nuevas aplicaciones biotecnológicas basadas en interferencia por RNA (RNAi) para el control de las enfermedades virales en plantas. En: *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Eds. V. Pallás et al. Ediciones MundiPrensa pp. 391-407.

Tenllado, F., and Díaz-Ruíz, J.R. (2007). El silenciamiento génico y el control de enfermedades en plantas. *Phytoma* 192, 54-59.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=35>



Patentes | Patents

- Tenllado, F., and Díaz-Ruíz, J.R. Fecha de prioridad: 2002. "Un método para interferir con la infección de virus en plantas/A method for interfering with virus infection in plants". Número de solicitud Nacional: 200101593. Número de solicitud Internacional: PCT/ES02/00319.



César Llave Correas
Científico Titular
cesarlave@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1999.
Postdoctoral, 2000-2001.
Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, USA.
Center for Gene Research and Biocomputing, 2001-2002.
Oregon State University, Corvallis, USA.
Investigador Ramón y Cajal, 2003.
CIB, CSIC.
Científico Titular, 2004.
CIB, CSIC.



Tomás Canto Ceballos
Científico Titular
tomas.canto@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1994.
Postdoctoral, College of Agriculture, 1995-1996.
Cornell University, Ithaca, USA.
Scottish Crop Research Institute, 1996.
Dundee, UK.
Investigador contratado, 1997-2007.
Scottish Crop Research Institute, Dundee, UK.
Científico Titular, 2007.
CIB, CSIC.

Investigador del equipo | Staff Scientist:

Dionisio López Abella, (Ad Honorem)

Otros Miembros | Other lab Members:

Livia Donaire Segarra
Inmaculada González Martín
Lucía Martínez Priego
Francisco Javier del Toro Serna.

Interacciones Planta-Medioambiente
Plant-Environment Interactions

Interacciones Moleculares Planta-Virus: Aproximaciones Proteómicas y de Silenciamiento por RNA

Molecular Plant-Virus Interactions: Proteomic and RNA Silencing Approaches

Las plantas han desarrollado complejas medidas defensivas frente a virus, que estos neutralizan con diversas estrategias. Durante la infección, el silenciamiento génico juega un papel crítico en las interacciones planta-virus al constituir una matriz reguladora de la expresión génica de virus y plantas. Nuestro grupo estudia las interacciones planta/virus/vector desde una perspectiva genómica y proteómica con objeto de identificar factores celulares y virales así como mecanismos que determinan el curso de la infección.

Plants have developed a variety of complex defensive strategies to neutralise viruses. Among the mechanisms that govern virus-plant interactions, gene silencing plays a critical role, as it constitutes a matrix that regulates both plant and viral gene expression. Our group studies plant/virus/vector interactions from a genomic and proteomic perspective, identifying the cellular and viral factors and mechanisms that determine the course of viral infections.

Nuestro trabajo persigue i) la identificación y estudio funcional de interacciones entre factores virales y del huésped o insecto vector durante el ciclo infeccioso de poty-, cucumo-, y hordeivirus. En particular, el estudio de proteínas virales con función supresora del silenciamiento, o involucradas en la transmisión horizontal por insectos vectores. También estudiamos el papel de componentes nucleares de la planta en el ciclo infeccioso de virus de RNA+. Las interacciones moleculares entre factores del virus y del huésped están constreñidas por la compartimentalización subcelular, y por las estructuras moleculares de orden superior de las que forman parte. A través del uso combinado de técnicas de Biología Celular para estudios en vivo y de herramientas moleculares in vitro pretendemos establecer una relación causal entre interacción y función biológica. ii) determinar la influencia del silenciamiento génico en el desarrollo de la infección viral, investigando el potencial regulador de los pequeños RNAs (sRNAs) del virus sobre moléculas diana: RNA y cromatina. La incorporación de los sRNAs a distintos efectores de silenciamiento ofrece un abanico de posibilidades para el control transcripcional y posttranscripcional de la expresión génica. Pretendemos elucidar el impacto de la actividad de sRNAs virales y del huésped sobre la acumulación y dispersión



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Canto, T., Aranda, M.A., and Fereres, A. (2008). Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology* 14, 2489-2500.

Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., and Llave, C. (2008). Structural and genetic requirements for the biogenesis of Tobacco Rattle Virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.* 82, 5167-517.

Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., and Llave, C. (2008). Silencing supresor activity of the Tobacco Rattle Virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* 376, 346-356.

Lewsey, M., Robertson, F.C., Canto T., Palukaitis, P., and Carr, J.P. (2007). Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J.* 50, 240-252.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets direct by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053-2056.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=35>



de virus, así como los mecanismos epigenéticos, principalmente dependientes sRNAs, que subyacen a los cambios transcriptómicos asociados a la infección. A través del estudio funcional de genes del huésped desregulados por el virus pretendemos esclarecer alguno de los procesos celulares críticos para el establecimiento y curso de la infección.

the higher order molecular structures they are part of. By combining Cell Biology tools for studies in vivo and molecular tools in vitro, we aim to establish a causal link between the interactions observed and their biological function. We also aim to determine the influence of gene silencing in the development of viral infection, studying the regulatory potential of small viral RNAs (sRNAs) on target molecules such as RNA and chromatin. The incorporation of sRNAs into different silencing effectors offers a wide range of possibilities for the transcriptional and post-transcriptional control of gene expression. We intend to elucidate the impact of viral and host sRNAs on the accumulation and spread of viruses, as well as on the mainly sRNA-dependent epigenetic mechanisms that underlie the transcriptomic changes associated to infection. Through the functional study of host genes deregulated by the virus, we hope to clarify some of the cellular processes critical to the establishment and course of viral infections.

We aim to identify and study the interactions between viral factors and factors from the host or insect vector, during the infectious cycle of poty-, cucumo-, and hordeiviruses. In particular, we study viral proteins with a suppressor or gene silencing function, or those that are involved in the horizontal transmission by insect vectors. We also study the role of plant nuclear components in the infectious cycle of RNA+ viruses. The molecular interactions between viral and host factors are constrained by their subcellular compartmentalisation and by

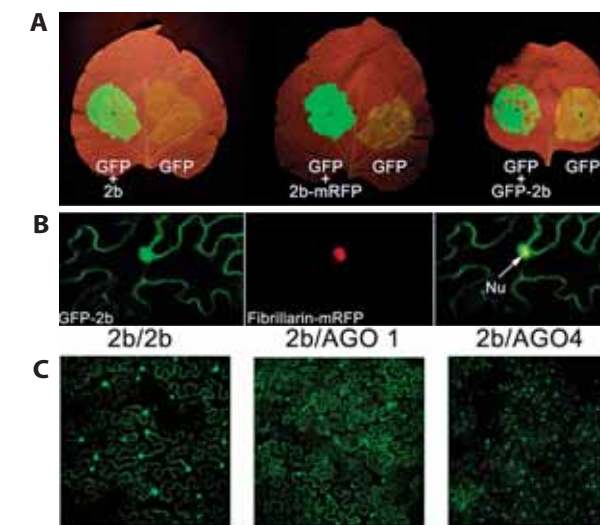
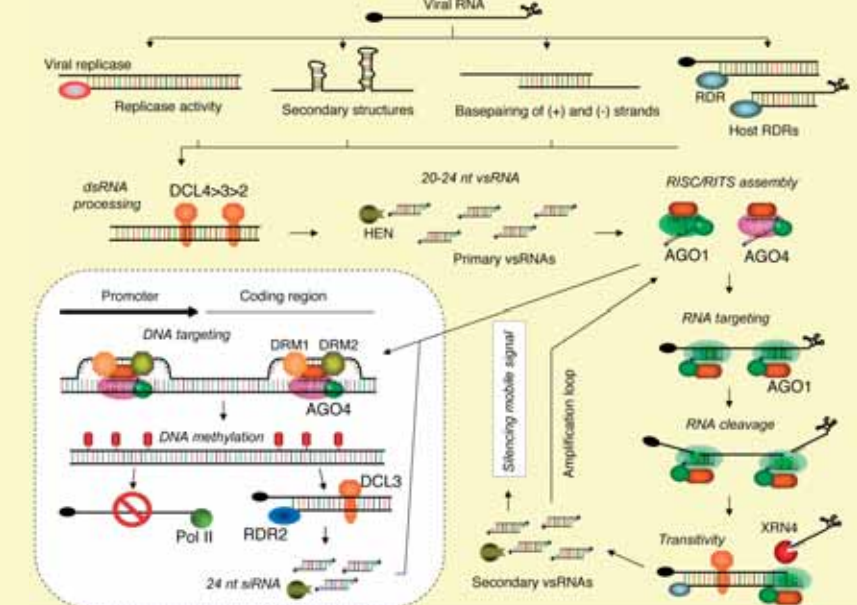


Fig. 2. Herramientas de Biología Celular para estudios funcionales. A) Expresión transitoria de genes en plantas: La expresión de GFP en lado derecho de hojas está deprimida por silenciamiento génico. Su co-expresión con supresores virales (2b de CMV, lado derecho de hojas) neutraliza esta defensa. B) El supresor de silenciamiento 2b co-localiza in vivo con Fibrilarina, una proteína nucleolar (Nu, panel derecho). C) Visualización de interacciones proteína-proteína por BiFC: de 2b consigo mismo, y con Argonauta 1 y 4.

Cell Biology tools for functional studies. A) Transient expression of genes in plants: the expression of GFP on the right side of leaves is depressed by the plants silencing defences. Its co-expression with a viral suppressor (CMV 2b, left side of the leaves) neutralises this defence mechanism. B) The CMV 2b suppressor of silencing co-localises with Fibrillarina, a nucleolar protein (Nu, right panel). C) Visualisation of the protein-protein interactions by BiFC: 2b self-interaction and that of 2b with Argonaute 1 and 4.

Fig. 1. Silenciamiento génico transcripcional y posttranscripcional inducido por virus vegetales. Los virus producen RNA bicatenarios que sirven como sustrato de enzimas Dicer (DCL) para la formación de pequeños RNAs (vsRNAs). Los vsRNA se asocian con proteínas AGO para guiar la degradación o la inhibición de la traducción del RNA, o la metilación del DNA complementario.

Transcriptional and post-transcriptional RNA silencing induced by plant viruses. Upon infection, plant viruses produce double-stranded RNA by a variety of mechanisms, which is processed by Dicer (DCL) enzymes into viral small RNAs (vsRNAs). These vsRNAs associate with AGO proteins to guide sequence-specific degradation or translational arrest of cognate RNA, or the methylation of homologous DNA.





Isabel García Luque
Investigadora Científica
igarcia@cib.csic.es

Ph.D. en Ciencias Biológicas, 1984.
Universidad Complutense de Madrid.
Científica Titular, 1987.
CIB, CSIC.
Investigadora Científica, 2007.
CIB, CSIC.



Mª Teresa Serra Yoldi
Científica Titular
mserra@cib.csic.es

Ph.D. en Farmacia, 1971.
Universidad Complutense de Madrid,
Postdoctoral, 1972.
Institut Pasteur, Paris, Francia.
INRA, 1973-1974.
Centre de Phytobacteriologie, Angers, Francia.
CNRS, 1977-1978.
Laboratoire de physiologie des organes vegetaux, Meudon,
Francia.
Científica titular, 1981.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Alfonso Bonilla Martínez
Josefa Fernández-Cabrera Bazán
Gema Osuna Tenorio
Fátima Tena Fernández

**Interacciones Planta-Medioambiente
Plant-Environment Interactions**

**Patógenesis de Virus de Plantas y
Mecanismos de Resistencia en
Plantas**

**Plant Viral Pathogenesis and Plant
Defence Mechanisms**

El interés de nuestro grupo consiste en estudiar la interacción virus-planta con el fin de conseguir nuevas herramientas para el desarrollo de estrategias de defensa antiviral duradera. Para ello, nuestra investigación se centra en (i) los mecanismos moleculares responsables de la gama de huéspedes de los tobamovirus en solanáceas, (ii) el efecto de la temperatura en la infección viral y en la resistencia antiviral, y (iii) la caracterización de genes del huésped que contribuyen a disminuir el daño provocado por la infección viral o se requieren para el establecimiento de la misma.

Our group aims to understand virus-plant interactions in order to find new tools to develop durable and sustainable antiviral defence strategies. To achieve these goals, we focus our research on: (i) the molecular mechanisms involved in the host range of tobamoviruses in Solanaceae; (ii) the effect of temperature changes on viral infection and plant virus resistance; and (iii) the characterization of host genes that diminish the damage inflicted by viral infection or that are required for infection to take place.

Patogénesis viral. Estamos analizando los mecanismos y elementos virales involucrados en la gama de huéspedes de los virus del moteado suave de la paprika y del pimiento en diversas solanáceas, habiendo establecido que PaMMV es defectivo para el movimiento a larga distancia tanto en la proteína de cubierta como en la polimerasa y que la inmunidad de las plantas de tomate a PMMoV reside en la polimerasa. Por otro lado, hemos establecido que el dominio de la helicasa es el responsable de la termosensibilidad de la cepa italiana de PMMoV frente a la termoresistencia de la cepa española, a pesar de la mayor agresividad patogénica en plantas de pimiento de la cepa italiana, y que pudiera ser en parte responsable de la menor incidencia en los cultivos.



Mecanismos de resistencia vegetal frente a las infecciones virales. Como sistema modelo utilizamos *Capsicum chinense* (L³L³) que es resistente a todos los tobamovirus excepto a los patotipos P_{1,2,3} y P_{1,2,3,4}, de PMMoV, y que es de tipo HR. Hemos identificado diversas proteínas y mRNAs cuya expresión se modifica tras la infección viral. Entre ellas, cabe destacar una proteína PR-1 básica cuya expresión está asociada específicamente a la inducción de la HR y que se acumula en el espacio extracelular. La identificación de este marcador nos proporciona una herramienta de gran utilidad en estos estudios. También hemos identificado una glutaredoxina cloroplastídica cuya expresión se incrementa tras la infección viral, ya sea en reacciones compatibles o incompatibles, y cuya expresión constitutiva confiere a las plantas una protección frente a la infección viral.

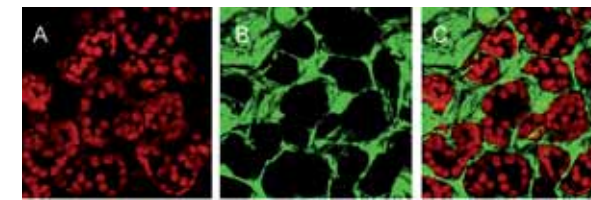


Fig. 1. Visualización mediante microscopía confocal de la proteína de fusión PR-1b::GFP en el espacio extracelular del mesófilo de *N. benthamiana* tras su expresión transitoria. (A) Cloroplastos; (B) PR-1b::GFP; (C) Superposición.

Confocal microscopy visualization of the PR-1b::GFP fusion protein in the extracellular space of *N. benthamiana* mesophyll after agroinfiltration. (A) Chloroplasts, (B) PR-1b::GFP and (C) Merged.



Fig. 2. Sintomatología a los 21d.p.i. en plantas de *N. benthamiana* infectadas con diferentes cepas virales. (C) control; (PMMoV-S) cepa española de PMMoV; (THI-9 y THI-10) virus quimeras; (PMMoV-I) cepa italiana de PMMoV-I.

Symptoms observed in *N. benthamiana*-infected plants at 21 d.p.i. (C) Control plants; (PMMoV-S) Spanish strain of PMMoV; (THI-9 and THI-10) chimera viruses; (PMMoV-I) Italian strain of PMMoV-I.

Viral pathogenesis. We are analyzing the mechanisms and viral elements involved in the host range of paprika and pepper mild mottle tobamoviruses in *Solanaceae* plants. We have established that PaMMV is defective in both the coat and polymerase proteins for viral long distance movement, and that the immunity of tomato plants against PMMoV resides in the polymerase protein. By contrast, we have found that the thermosensitivity of the Italian strain of PMMoV resides in the helicase domain. Thermosensitivity may be a determinant for the limited spread of this viral strain in pepper cultivars around the world when compared to the Spanish strain, although the Italian strain is more aggressive towards pepper resistance genes.

Plant defence mechanisms against plant viral infections: As a model system we use *C. chinense* (L³L³) plants resistant to most of the tobamoviruses, except the P_{1,2,3} and P_{1,2,3,4} pathotypes of PMMoV. This resistance is manifested as an HR. We have identified distinct proteins and mRNAs that are differentially expressed upon viral infection. A basic PR-1 is of particular interest as its expression is specifically associated to HR induction and it accumulates in the extracellular space. The identification of this HR marker makes it a very useful tool for our studies. Moreover, we have identified a chloroplast glutaredoxin that is induced after both compatible and incompatible plant-virus interactions. The constitutive expression of this protein in plants diminishes viral accumulation.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Elvira, M.I., Molina Galdeano, M., Gilardi, P., García-Luque, I., and Serra, M.T. (2008). Proteomic analysis of Pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L³ plants. **J. Exp. Bot.** 59, 1253-1265.

De María, N., Guevara, A., Serra M.T., García-Luque, I., González-Sama, A., García de Lacoba, M., de Felipe, M.R., and Fernández-Pascual, M. (2007). Putative porin of *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) bacteroids induced by glyphosate. **App. Env. Microbiol.** 73, 5075-5082.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=34>

Nucleolo, Proliferación Celular y Microgravedad en Plantas

Plant Cell Nucleolus, Proliferation and Microgravity



Francisco Javier Medina Díaz
Investigador Científico
fjmedina@cib.csic.es

Ph.D. Ciencias Biológicas, 1979.
Univ. Complutense de Madrid.
Postdoctoral, 1979-1980.
Inst. Biología Celular, CSIC.
Científico Titular, 1981.
CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2003.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Raúl Herranz Barranco
Ana Isabel Manzano Pérez
Antonio Manrique Campaña
Isabel Matía Jurado
Mercedes Carnota Romero.

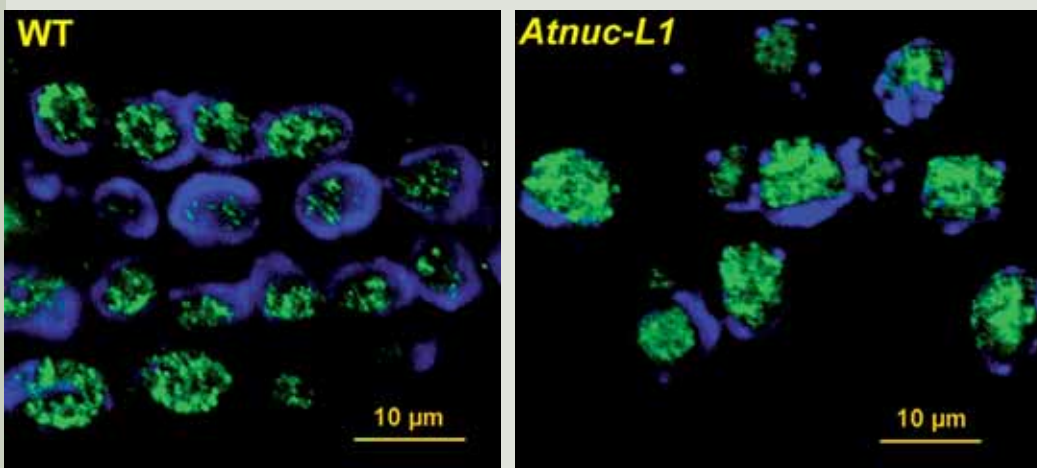


Nuestro modelo experimental es el sistema funcional proliferación-crecimiento celular en el meristemo radicular de *Arabidopsis thaliana*. Estudiamos las relaciones entre el ciclo celular y la funcionalidad del nucleolo en la biogénesis de ribosomas. Especialmente nos interesan las alteraciones de estas funciones inducidas por cambios en las condiciones gravitatorias medioambientales. Para ello estudiamos plántulas obtenidas de semillas germinadas en el espacio o en dispositivos terrestres simuladores de la microgravedad o generadores de hipergravedad.

As our experimental model, we use the cell proliferation and growth in the root meristem of *Arabidopsis thaliana* to study the relationships between the cell cycle and the function of the nucleolus in ribosome biogenesis. We are especially interested in the alterations induced in these activities by changes in environmental gravitational conditions. Accordingly, we study seedlings obtained from seeds germinated either in space or in ground-based devices simulating microgravity or generating hypergravity.

Fig. 1. Observación a microscopía confocal mediante hibridación in situ de la transcripción del pre-rRNA en plantas mutantes para el gen principal de la nucleolina (*Atnuc-L1*) y en silvestres (WT). La transcripción no está afectada en el mutante y su tasa es mayor, en respuesta a una mayor demanda de ribosomas.

In situ hybridization of pre-rRNA transcription in mutant plants for the major nucleolin gene (*Atnuc-L1*) and in wild type plants (WT). Transcription is unaffected in the mutant and it proceeds at a higher rate, as a response to the higher demand of ribosomes.



Con respecto al proceso celular que es el objeto principal de nuestro estudio, la biogénesis de ribosomas, estudiado en condiciones medioambientales standard, hemos investigado el papel de una proteína esencial en la regulación del proceso, la nucleolina, mediante la utilización de un mutante de inserción que suprime la expresión del gen mayoritario de la nucleolina de *Arabidopsis*. Hemos podido demostrar que la nucleolina interviene decisivamente en la organización estructural del nucleolo y en diferentes etapas del procesamiento del RNA precursor de los rRNAs. En cuanto a las alteraciones inducidas por el ambiente de microgravedad, en estas condiciones se produce un incremento en la tasa de proliferación celular, acompañada de una disminución de la producción de ribosomas, lo cual implica un menor crecimiento celular. Estos resultados muestran que la ausencia de gravedad supone un estrés de considerable magnitud para la planta, capaz de desacoplar dos procesos celulares que están estrictamente coordinados y son mutuamente interdependientes en condiciones de gravedad terrestre normal. En estos momentos preparamos un nuevo experimento espacial, en la ISS, para investigar en la raíz de *Arabidopsis* las alteraciones en la distribución de hormonas, como las auxinas y el ABA, causadas por la ausencia de gravedad y responsables de las alteraciones gravitropicas (cambios en la dirección del crecimiento) y gravimórficas (aumento de longitud, diferente patrón de formación de raíces laterales) descritas en estas condiciones. El estudio consistirá en la detección y cuantificación de cambios en la expresión de genes de respuesta hormonal.

In terms of ribosome biogenesis, we have investigated the role played by an essential regulator of this process, nucleolin, in standard environmental conditions, using an insertion mutant that suppresses the expression of the major nucleolin gene in *Arabidopsis*. We demonstrated that nucleolin is decisive for the structural organization of the nucleolus and for several steps in ribosomal RNA precursor processing. In terms of the alterations induced by microgravity, we detected an increase in the rate of cell proliferation that was accompanied by a reduction in ribosome production, leading to less cell growth. These results show that weightlessness is a considerable stress to the plant, capable of uncoupling two closely related cellular processes that are mutually dependent in normal conditions of ground gravity. We are currently preparing a new space experiment at the ISS to study the altered distribution of hormones in the root of *Arabidopsis* that may be caused by the absence of gravity (e.g., auxins and ABA). These changes may be responsible for the gravitropic alterations (changes in the direction of growth) and gravimorphic alterations (increase in length, different pattern of lateral root formation) that were previously described in these conditions. This study will also go further to detect and quantify the changes in the expression of hormone-responsive genes.

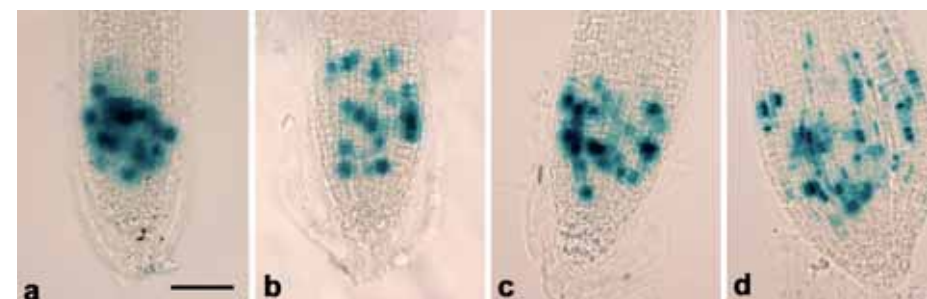


Fig. 2. Expresión del gen de la ciclina B1 detectada mediante la reacción histoquímica GUS en la raíz de plántulas crecidas en un dispositivo de levitación magnética. (a): Control, fuera del dispositivo. (b), (c) y (d): Posiciones del dispositivo correspondientes a 0 g*, 1g* y 2 g*, respectivamente (g*=gravedad efectiva).
Expression of the cyclin B1 gene detected by the GUS histochemical reaction in roots of seedlings grown in a magnetic levitation instrument. (a) Control, grown outside the magnet. (b), (c) and (d) Positions within the magnet corresponding to 0 g*, 1g* and 2 g*, respectively (g*: effective gravity).



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Herranz, R., Laván, D.A., Medina, F.J., van Loon, J.J.W.A., and Marco, R. (2008). Drosophila GENE experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS: II. Effects of the containment constraints. **Microgravity Sci. Technol.** In Press. DOI 10.1007/s12217-008-9097-1.

Sáez-Vásquez, J., and Medina, F.J. (2008). The Plant Nucleolus. In: "Advances in Botanical Research" (J.C. Kader, M. Delseny eds.) vol. 47, pp. 1-46.

Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., and Sáez-Vásquez, J. (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. **Mol. Biol. Cell.** 18, 369-379.

Matía, I., González-Camacho F., Marco, R., Kiss, J.Z., Gasset, G., van Loon, J., and Medina, F.J. (2007). The "Root" experiment of the "Cervantes" Spanish Soyuz Mission: Cell proliferation and nucleolar activity alterations in Arabidopsis roots germinated in real or simulated microgravity. **Microgravity Sci. Technol.** 19(5/6), 128-132.

Van Loon, J.J.W.A., Marco, R., and Medina, F.J. (Guest Editors) (2007). European National-ESA Soyuz Missions to the International Space Station (2001-2005) (Special Issue). **Microgravity Sci. Technol.** Vol. 19, Issue 5/6.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/grupo.publicaciones.php?idgrupo=32>



María del Carmen Risueño Almeida
Profesora de Investigación
risueno@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1967.
Postdoctoral, 1967-1968.
Univ. de Marseille-Luminy, Marsella, Francia.
CNRS/INSERM, (1970-1971) Villejuif, Francia.
DKFZ, (1975-1976) Heidelberg, Alemania.
Científica Titular, 1968, Investigadora Científica, 1988 y
Profesora de Investigación, 2002, CIB, CSIC.



Pilar Sánchez-Testillano
Investigadora Científica
testillano@cib.csic.es

Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1991.
Postdoctoral, 1991 CNRS, Villejuif, Francia.
Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1992.
Científica Titular, 1996 y Investigadora Científica, 2008
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Pablo González-Melendi
- María José Coronado
- María Rodríguez-Serrano
- Deepak Prem
- Ivett Barany
- María Teresa Solís
- Eduardo Corredor
- Ascensión Cuesta
- Estrella López
- Laura Fernández del Ama
- Carlos Almarza Sanz

**Interacciones Planta-Medioambiente
Plant-Environment Interactions**

**Desarrollo en Plantas y
Arquitectura Nuclear
Plant Development and Nuclear
Architecture**

La inducción de embriogénesis en polen por estrés es una herramienta biotecnológica que se emplea en programas de mejora vegetal y reforestación como un método rápido de generar nuevas variedades mediante la producción de plantas doble-haploides. Este proceso tiene un impacto creciente en la investigación en agricultura sostenible, explotación y conservación de recursos forestales y control ambiental. Además, estamos explorando nuevas posibilidades para el tratamiento de fitopatologías que ofrece el emergente campo de la nanotecnología, aún no explorado en plantas.

Stress-induced pollen embryogenesis is a biotechnological tool used in plant breeding and re-forestry programmes as a convenient and fast way to generate new varieties by producing double-haploid plants. This process has an ever increasing impact on research into sustainable agriculture, the exploitation of forest resources and environmental control. We also focus on emerging plant nanobiotechnology which opens new possibilities for the treatment of phytopathologies.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

González-Melendi, P., Fernández-Pacheco, R., Coronado, M.J., Corredor, E., Testillano, P.S., Risueño, M.C., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, R., and Pérez-de-Luque, A. (2008). Nanoparticles as smart treatment delivery systems in plants: first report of penetration inside living plants and assessment of different techniques for their visualisation. **Ann. Botany** 101, 187-195.

Solís, M.T., Pintos, B., Prado, M.J., Bueno, M.A., Raska, I., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2008). Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.) **Plant Sci.** 174, 597-605.

Andreu, V., Collados, R., Testillano, P.S., Risueño, M.C., Picorel, R., and Alfonso, M. (2007). In situ molecular identification of the plastid omega3 fatty acid desaturase FAD7 from soybean: evidence of thylacoid membrana localization. **Plant Physiol.** 145, 1336-1344.

Coronado, M.J., Testillano, P.S., Wilson, C., Vicente, O., Heberle-Bors, E., and Risueño, M.C. (2007). The in situ molecular identification of the Ntf4-MAP kinase expression sites in maturing and germinating pollen. **Biol. Cell.** 99, 209-221.

Testillano, P.S., Georgiev, S., Mogensen, L., Coronado, M.J., Dumas, C., Risueño, M.C., and Matthys-Rochon, E. (2004). Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis. **Chromosoma**, 112, 342-349.

Ver más en: http://www.cib.csic.es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=33

Para explotar de forma eficiente el proceso de embriogénesis de polen para producción de plantas doble-haploides, el principal objetivo es el análisis de los sucesos clave que limitan su inducción y de los mecanismos que controlan la reprogramación celular. Esta investigación se lleva a cabo en especies hortícolas, modelo y de interés económico, cereales, árboles frutales y forestales.

Las líneas de investigación concretas son:

- Análisis durante el desarrollo y embriogénesis del polen, y tras la inducción por estrés de:
 - a) Proteínas de estrés y señalización, como HSPs, MAPKs y LOX, su presencia, distribución subcelular, expresión in situ y traslocaciones en relación a la respuesta a estrés y transducción de la señal,
 - b) Muerte celular programada (PCD) y determinación de sus rutas, apoptosis o autofagia, para determinar si alguno de estos procesos está implicado en la respuesta al estrés inductor de embriogénesis o en el desarrollo embriogénico,
 - c) Marcas epigenéticas y cambios de los patrones epigenéticos (acetilación y metilación de histonas y metilación del DNA) en relación al cambio de programa de desarrollo,
 - d) Perfiles de expresión génica, mediante análisis transcriptómico,
 - e) Remodelación de los dominios funcionales del núcleo relacionados con la reprogramación celular y asociados a la PCD,
 - f) Mecanismos de diploidización en embriones derivados de microsporas,
 - g) Desarrollo y puesta a punto de técnicas de identificación molecular in situ y microscopía correlativa.
- Nanopartículas para protección vegetal: Análisis de la internalización y transporte de nanocomponentes en los tejidos y células vegetales, así como del potencial de adquisición de nanopartículas de las plantas y su traslocación e interacciones con las células vegetales, en calabaza y Medicago.

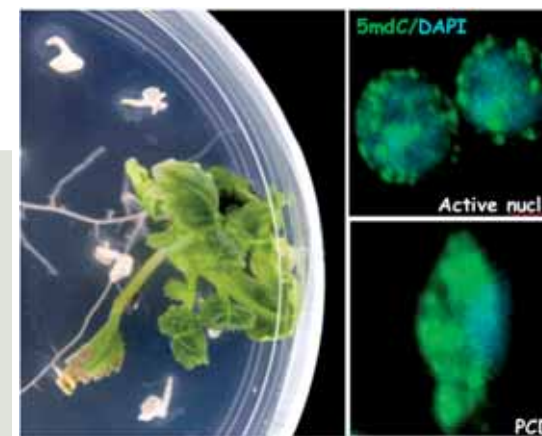


Fig. 1. Desarrollo y germinación de embriones derivados de polen, y patrones de metilación de DNA en células activas y apoptóticas visualizados con inmunofluorescencia e inmunomarcado con oro de 5-deoxi-metil-citidina (5dmC) y microscopía láser confocal y electrónica respectivamente.

Pollen-derived embryo development and germination, and nuclear DNA methylation patterns in active and apoptotic cells as visualized by 5-deoxy-methyl-cytidine (5dmC) immunofluorescence and immunogold labelling in confocal and electron microscopy, respectively.

To efficiently exploit pollen embryogenesis for double-haploid plant production, the main objective is to analyse key events that limit the induction and the mechanisms that control the cell reprogramming. This research is approached in horticultural, model, and economically interesting species, such as cereals, fruit and forest trees.

Among our specific research lines we analyse signalling and stress proteins during pollen development and embryogenesis, and after stress induction, such as HSPs, MAPKs and LOX. We also study their presence, subcellular distribution, expression in situ and translocation in relation to stress responses and signal transduction. In addition, we focus on programmed cell death (PCD) and its associated pathways to determine whether apoptosis or autophagy-like processes are involved in the response to the embryogenesis-inductive stress treatment or embryo development. Epigenetic marks and the changes in epigenetic patterns (acetylation and methylation of histones, and DNA methylation) are studied in relation to the switch of developmental programmes. Similarly, we study the gene expression profiles by transcriptomic analyses, as well as the remodelling of nuclear functional domains in relation to cell reprogramming and PCD. We are also interested in the mechanisms of diploidisation in microspore-derived embryos and we have developed and established techniques for in situ molecular identification and correlative microscopy.

We also use nanoparticles for crop protection to analyse substance internalization and transport in plant tissues by nanocomponents. We also assess the nanoparticle uptake potential of plants, and their translocation and interaction with plant cells in pumpkin and Medicago.

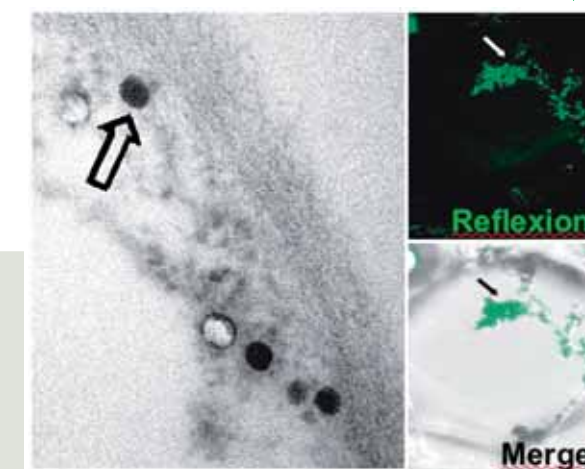


Fig. 2. Penetración y transporte de nanopartículas en células vegetales: localización subcelular en el citoplasma de células parenquimáticas de calabaza, visualizadas por reflexión en microscopía láser confocal y por microscopía electrónica.

Nanoparticle penetration and transport in plant cells. Subcellular localization in the cytoplasm of parenchymatic cells of pumpkin, as seen by confocal and electron microscopy.



Julio Salinas Muñoz
 Profesor de Investigación
 salinas@cib.csic.es

Ph.D., 1983.
 Universidad Complutense de Madrid
 Postdoctoral, 1983-1986.
 Institut Jacques Monod, Paris, Francia.
 Investigador, 1986-2006
 INIA.
 Visiting scientist, (1989-1991).
 The Rockefeller University, New York, USA.
 Profesor de Investigación, 2006.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

María del Mar Castellano Moreno
 Rafael Catalá Rodríguez
 Teresa Domínguez López
 Tamara Hernández Verdeja
 Esmeralda Martí Sanchis
 Carlos Perea Resa
 Miguel Ángel Rodríguez Milla

Fig. 1. RC17 es una proteína nucleolar implicada en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas y al estrés salino. Ensayo inmunohistoquímico sobre plantas transgénicas de *Arabidopsis* expresando la fusión RC17::GFP. La proteína nucleolar At-nucleolina se marcó con anticuerpos secundarios ligados a RFP. Los nucleos se marcaron con DAPI. Se muestra también una superposición de imágenes.

RC17 is a nucleolar protein involved in *Arabidopsis* response to cold and salt stress. Immunohistochemical assay of transgenic *Arabidopsis* expressing the RC17::GFP fusion. The nucleolar protein At-Nucleolin was visualized using secondary antibodies linked to RFP. DAPI staining was used as nuclear marker. A merged image is also shown.

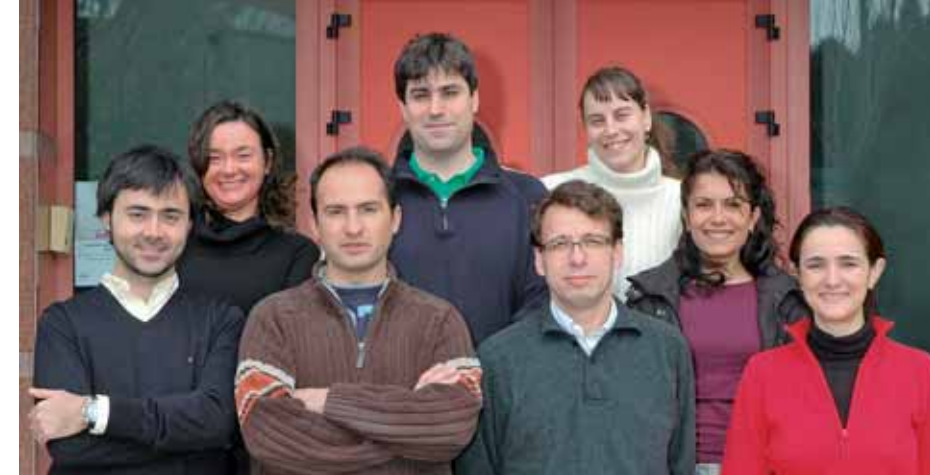
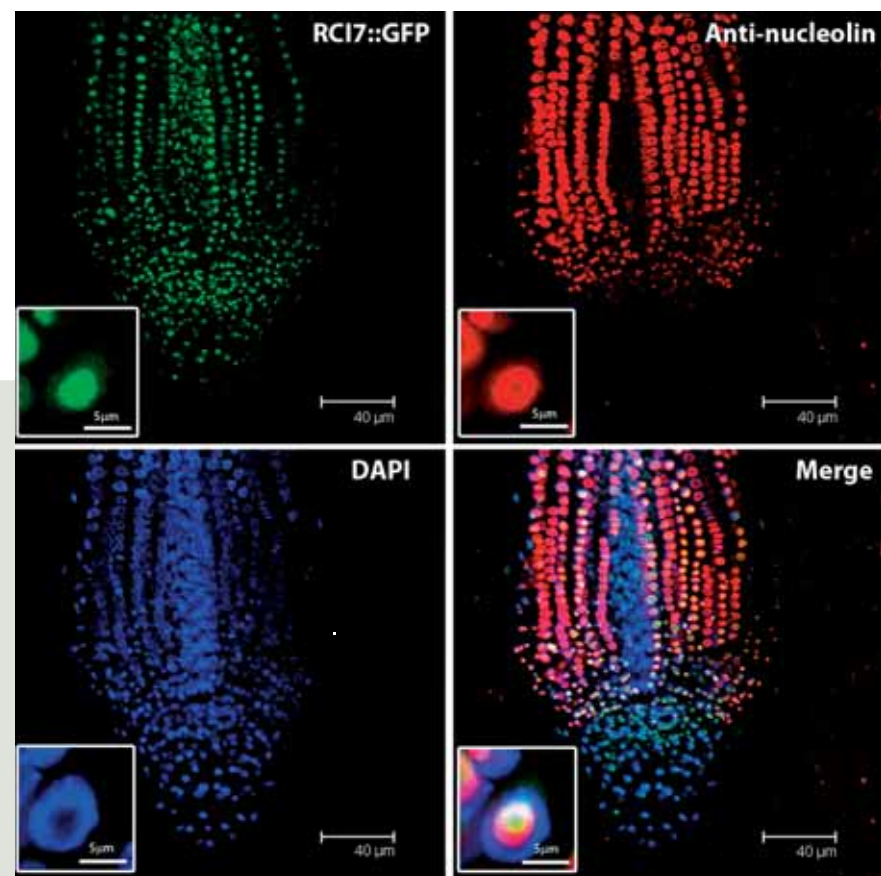
Interacciones Planta-Medioambiente
 Plant-Environment Interactions

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas
Plant Molecular Biology Laboratory

Contrariamente a la mayoría de los seres vivos, las plantas son incapaces de desplazarse, por lo que su desarrollo y reproducción dependen de las condiciones ambientales que las rodean. Esto es especialmente relevante cuando se trata de condiciones ambientales adversas como temperaturas extremas, sequía o salinidad en los suelos. Para sobrevivir a estas condiciones las plantas han desarrollado respuestas adaptativas muy complejas. En nuestro laboratorio, estamos interesados en comprender los mecanismos moleculares que controlan dichas respuestas.

In contrast to other living organisms, plants are sessile and need to adjust their growth patterns according to the environmental conditions. This is of special relevance in the case of adverse conditions such as extreme temperatures, drought or saline soils. To survive under these circumstances, plants have evolved sophisticated adaptive responses. Our laboratory is interested in understanding the molecular mechanisms that control these responses.

Una de las respuestas adaptativas más interesantes que las plantas han desarrollado es el denominado proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Mediante este proceso, distintas especies incrementan su tolerancia a las heladas tras haber estado expuestas a



temperaturas entre 0°C y 10°C. Como consecuencia del proceso de aclimatación, además, algunas plantas también pueden incrementar su tolerancia a otros estreses abióticos tan importantes como el hídrico y el salino. Resulta evidente que elucidar los mecanismos moleculares que controlan el proceso de aclimatación no solo tiene un interés básico, para comprender como las plantas crecen y se desarrollan, sino también un potencial biotecnológico para generar herramientas moleculares que puedan ser utilizadas en programas de mejora. Durante los últimos años, hemos identificado y caracterizado distintos intermediarios implicados en la señalización del proceso de aclimatación en *Arabidopsis*. Como cabía esperar, algunos de estos intermediarios también median la respuesta de *Arabidopsis* al estrés hídrico y al estrés salino, lo que nos está permitiendo estudiar de que manera las plantas responden coordinadamente a distintos estreses abióticos. Los resultados obtenidos han revelado que la respuesta de *Arabidopsis* a situaciones ambientales adversas, además de generar una importante reprogramación de la expresión génica, está fuertemente regulada tanto a nivel post-transcripcional como post-traducciona. En este momento, nuestros objetivos están dirigidos a (i) establecer como funcionan los intermediarios que hemos identificado; (ii) identificar las relaciones que existen entre aquellos intermediarios que transducen la misma señal, y (iii) determinar como los intermediarios identificados están regulados a nivel post-transcripcional y post-traducciona.

One of the most interesting adaptive responses plants have evolved is the process of cold acclimation. By means of this process, many plants from temperate regions can increase their tolerance to freezing after being exposed for some days to low, non-freezing temperatures (0-10°C). Interestingly, cold acclimation may also enhance plant tolerance to other abiotic stresses, such as water deficit and high salinity, evidencing that important crosstalk exists between the signaling to these stresses. Understanding the molecular mechanisms that control cold acclimation should provide essential information on how plants coordinately integrate responses to different adverse environmental conditions, enabling them to grow and develop satisfactorily. Furthermore, this information has significant biotechnological potential in generating molecular tools to improve crop tolerance to important abiotic stresses. In recent years, we have identified and characterized several signaling intermediates involved in cold-acclimation response in *Arabidopsis*. As expected, some of them are also implicated in *Arabidopsis* response to cold-related stresses such as dehydration and high salinity. Through biochemical and genetic analyses, our current research programme aims to establish how these signaling intermediates exert their functions and to identify the relationships between intermediates that transduce the same signal. In addition, we are investigating how these signaling intermediates are regulated at the post-transcriptional and post-translational level.



Fig. 2. La proteína nucleolar RC17 juega un papel importante en el desarrollo de *Arabidopsis*. (A) Plántulas silvestres (ecotipo *Ler*) de 4 días de edad; (B) Plántulas mutantes *rci7* de 4 días de edad. Nucleolar protein RC17 plays an important role in *Arabidopsis* development. (A) Wild-type 4-day-old seedlings (*Ler* ecotype); (B) Four-day-old *rci7* mutant seedlings.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F., and Ferrando, A. (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating Abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol.* 148, 1094-1105.

Schapiro, A.L., Voigt, B., Jasik, J., Rosado, A., López-Cobollo, R., Menzet, J., Salinas, S., Mancuso, D., Valpuesta, V., Balíska, F., and Botella, M.A. (2008). *Arabidopsis* Synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell* 20, 3374-3388.

Medina, J., Ballesteros, M.L., and Salinas, J. (2007). Phylogenetic and functional analysis of *Arabidopsis* RC12 genes. *J. Exp. Bot.* 58, 4333-4346.

Novillo, F., Medina, J., and Salinas, J. (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 21002-21007.

Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression, and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3985-3990.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/grupo.php?idgrupo=62>



José Luis García López
 Profesor de Investigación
 jlgarcia@cib.csic.es

Ph.D. Ciencias Químicas, 1980.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Posdoctoral, 1982.
 University of Stony Brook New York, USA.
 Antibióticos S.A. (1982-1986).
 Científico Titular, 1986.
 CIB, CSIC.
 Investigador Científico, 1990 y Profesor de
 Investigación, 2001. CIB, CSIC.

Investigadores del equipo | Staff Scientists:

Eduardo Díaz Fernández
 María Auxiliadora Prieto Jiménez

Otros Miembros | Other lab Members:

Manuel Carmona Pérez
 Beatriz Galán Sicilia
 María del Valle Morales Ruiz
 José Ramos Vivas
 M^a Teresa Zamarro Molina
 Blas Blázquez Castiñeira
 Gonzalo Durante Rodríguez
 Laura Isabel De Eugenio Martínez
 Isabel Fernández Escapa
 Javier Fernández Juárez
 Esther García Fernández
 Javier García Hidalgo
 Isabel María Manso Cobos
 Virginia Martínez López
 Juan Nogales Enrique Antonio
 Daniel Prieto Prieto
 Julio Miguel Rubio Aranda
 Iria Uhía Castro
 Jonathan Andrés Valderrama Traslaviña
 Ana Valencia Hernando
 Mercedes Zazo Guío
 Nina Dinjaski

Microbiología para el Desarrollo Sostenible
 Microbiology for Sustainable Development

Biología Medioambiental Environmental Biotechnology

El grupo fue creado con el fin de explorar y explotar la capacidad bacteriana para degradar contaminantes y sintetizar biopolímeros, contribuyendo así a la sostenibilidad del planeta. Hemos realizado contribuciones pioneras sobre las rutas de degradación, y sobre la regulación de los genes y las enzimas que constituyen las rutas catabólicas de compuestos aromáticos. Los procesos de biodesulfuración, la hidrólisis de compuestos beta-lactámicos e hidratos de carbono, y otros procesos de biotransformación, han sido también motivo de interés de nuestra investigación.

This group was created to explore and exploit the capacity of bacteria to degrade pollutants and to produce biopolymers that might contribute to the sustainability of our planet. We have made pioneering contributions to the understanding of degradative pathways, and in relation to the regulation of the genes and enzymes that constitute the catabolic pathways of aromatic compounds. We have also been interested in the study of processes such as biodesulphurization, beta-lactamic and carbohydrate hydrolysis and other biotransformation processes.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Blázquez, B., Carmona, M., García, J.L., and Díaz, E. (2008). Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ. Microbiol.* 10, 474-482.

Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M.T., García, J.L., Díaz, E., and Carmona, M. (2008). New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology* 154, 306-316.

Galán, B., Manso, I., Kolb, A., García, J.L., and Prieto, M.A. (2008). The role of FIS protein in the physiological control of the expression of the *Escherichia coli* meta-hpa operon. *Microbiology* 154, 2151-2160.

Jiménez, J.I., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Ginalski, K., Rychlowski, L., García, J.L., and Díaz, E. (2008). Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 11329-11334.

De Eugenio, L.I., García, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., San Román, J., García, J.L., and Prieto, M.A. (2007). Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chem.* 282, 4951-4962.

Ver más en: http://www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=11

Nuestra actividad se centra en el análisis del catabolismo de contaminantes (por ejemplo, compuestos aromáticos y esteroides) en organismos modelo aerobios, e.g., *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Mycobacterium smegmatis*, y anaerobios, e.g., *Azoarcus* sp. cepa CIB. Estos análisis serán útiles para obtener nuevas bacterias, mediante la manipulación de sus genes/rutas por ingeniería genética y metabólica, capaces de remediar de manera más eficiente los ambientes contaminados. Estamos dedicando especial atención al catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, a nivel genético y bioquímico, ya que este conocimiento puede ser útil también para el diseño de procesos industriales verdes de biotransformación para producir productos químicos, como productos intermedios farmacéuticos, biopolímeros, etc. Con este propósito tenemos en curso la secuenciación, anotación y el análisis funcional del genoma completo de *Azoarcus* sp. CIB. Además, estamos aprovechando nuestro conocimiento sobre el metabolismo de *P. putida* para producir nuevos bioplásticos funcionalizados (polihidroxialcanoatos) mediante diferentes enfoques de ingeniería metabólica. En este ámbito, se están explotando las nuevas herramientas de la genómica y la Biología de Sistemas para descifrar la complejidad de estos procesos a fin de aumentar la eficiencia de la producción. También estamos aplicando técnicas de Biología Sintética para construir circuitos de regulación genética artificiales para la reprogramación del metabolismo celular con fines ambientales. La diversidad bacteriana se está explorando por tecnologías metagenómicas, con el propósito de aislar nuevos genes y enzimas útiles para diferentes aplicaciones biotecnológicas. La colaboración con empresas biotecnológicas en el campo de la biocatálisis/biotransformación (Química Sostenible) facilitará la puesta en práctica de nuestras próximas contribuciones a la sostenibilidad del planeta.

We focus our activities on analysing the catabolism of pollutants (e.g., aromatic compounds and steroids) in aerobic (e.g., *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Mycobacterium smegmatis*) and anaerobic (e.g., *Azoarcus* sp. strain CIB) model organisms. These analyses will be useful to obtain new bacteria capable of more efficiently remediating polluted environments by manipulating their genes/pathways through genetic and metabolic engineering. We pay special attention to the anaerobic catabolism of aromatics at the genetic and biochemical levels, since this knowledge may also be useful to design green industrial biotransformation processes to produce chemicals, such as pharmaceutical intermediates, biopolymers, etc. Accordingly, the sequencing, annotation and functional analysis of the complete *Azoarcus* sp. (strain CIB) genome is in progress. In addition, we are taking advantage of our knowledge of *P. putida* metabolism to produce new functionalized bioplastics (polyhydroxyalkanoates) using different metabolic engineering approaches. In this field, we exploit new genomics and Systems Biology tools to decipher the complexity of these processes so as to increase the production efficiency. We are also applying Synthetic Biology methods to construct artificial genetic regulatory circuits to reprogramme cell metabolism for environmental purposes. We are exploring the bacterial diversity by metagenomic techniques in order to isolate new genes and enzymes useful for different biotechnological applications. Ongoing collaborations with biotechnological companies in the field of biocatalysis/biotransformation (Sustainable Chemistry) will help pave the way for our forthcoming contributions to assist in sustaining the planet.

Fig. 2. *Azoarcus* sp. CIB es una bacteria anaeróbica facultativa que degrada varios compuestos aromáticos en condiciones de anaerobiosis o de aerobiosis utilizado como un sistema modelo en procesos biorremediación. El genoma de esta cepa ha sido recientemente secuenciado y utilizado para construir un mapa metabólico que permitirá llevar a cabo diferentes estudios de Biología de Sistemas.

Azoarcus sp. CIB is a facultative anaerobe that degrades several aromatic compounds in both aerobic and anaerobic conditions, and that is used as a model system for bioremediation purposes. The genome of this strain has recently been sequenced and used to create a metabolic map to carry out System Biology studies.

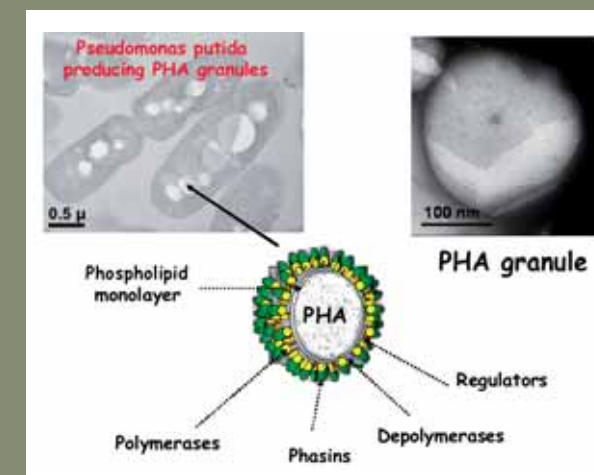
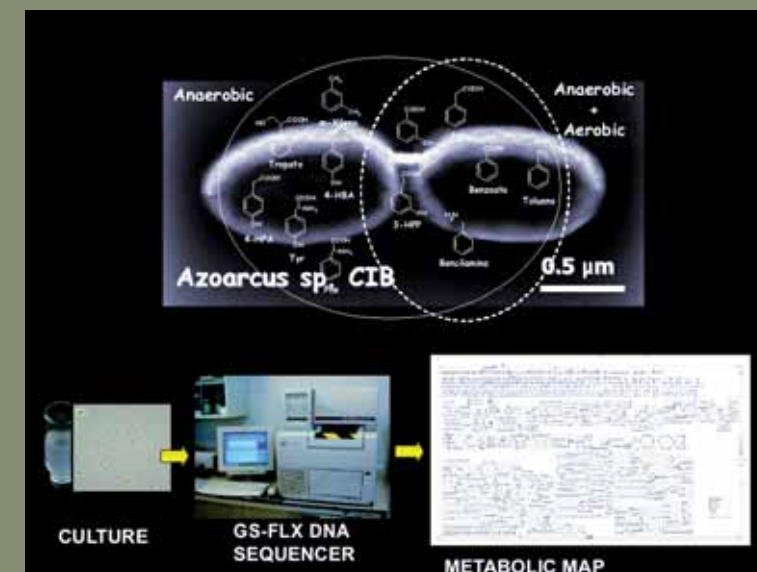


Fig. 1. *Pseudomonas putida* acumula bioplásticos en forma de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA). Estos gránulos presentan una composición y estructura complejas y están constituidos por varias proteínas que soportan su estructura (Fasinas) y enzimas implicadas en la síntesis e hidrólisis del PHA.

Pseudomonas putida accumulates bioplastics as polyhydroxyalkanoate (PHA) granules. These granules have a complex composition and structure, involving a number of support proteins (phasins), and several enzymes involved in the synthesis and hydrolysis of PHA.

Ángel T. Martínez Ferrer
 Profesor de Investigación
 atmartinez@cib.csic.es



Ph.D. Universidad de Navarra, 1976.
 Postdoctoral, 1977-1978.
 Centre de Pédologie Biologique, CNRS, Vandoeuvre-les-Nancy, France.
 Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1978-1979.
 Baarn y Delft, The Netherlands.
 Científico Titular, 1981.
 CIB, CSIC.
 Profesor de Investigación, 2004.
 CIB, CSIC.

María Jesús Martínez Hernández
 Investigadora Científica
 mjmartinez@cib.csic.es



Ph.D. Universidad Complutense de Madrid, 1980.
 Postdoctoral, 1980-1986.
 Inst. Jaime Ferrán de Microbiología, CSIC.
 Científica Titular, 1986 e Investigadora Científica, 2007,
 CIB, CSIC.
 Vicedirectora CIB, CSIC desde 2004.

Investigadores del equipo | Staff Scientists:

J. Antonio Leal Ojeda (*Ad Honorem*)
 Alicia María Prieto Orzanco
 Susana Camarero Fernández

Otros Miembros | Other lab Members:

Patricia Ferreira Neila
 Miguel Jurado García-Posadas
 David Ibarra Trejo
 Yuta Miki
 Marta Pérez Boada
 Javier Ruiz Dueñas
 Víctor Barba Cedillo
 Beatriz Casas Veiga
 Ana I. Cañas Portilla
 Eva García Ruiz
 Aitor Hernández Ortega
 Ángeles Martínez-Alcalá García
 María Morales Esteban
 Elvira Romero Guzmán
 Davinia Salvachúa Rodríguez
 María José Tobajas

**Microbiología para el Desarrollo Sostenible
 Microbiology for Sustainable Development**

**Biología para la Biomasa
 Lignocelulósica
 Biotechnology for Lignocellulosic
 Biomass**

La lignina es un polímero aromático que se encuentra en las paredes celulares de las plantas, donde protege a los polisacáridos de la degradación. Para poder utilizar la celulosa, uno de los mayores reservorios del carbono fijado por fotosíntesis, es necesario alterar o eliminar la lignina. Entender los mecanismos de transformación o degradación microbiana de este polímero, y otros compuestos recalcitrantes, permitirá desarrollar aplicaciones biotecnológicas para un desarrollo sostenible.

Lignin is an aromatic polymer that protects plant cell-wall polysaccharides from degradation. The use of cellulose as a renewable raw-material, one of the main reservoirs of the carbon fixed by photosynthesis, requires the prior modification or removal of lignin. Better understanding the microbial mechanisms that transform or degrade this complex polymer, and other recalcitrant compounds, will enable us to develop biotechnological applications for future sustainable development.

El grupo ha conseguido importantes avances en el conocimiento de la degradación de la lignina, y otros compuestos recalcitrantes de interés industrial y medioambiental, utilizando hongos y sus enzimas. En los últimos años ha enfocado su actividad hacia diferentes usos de la biomasa con el fin de desarrollar procesos ambientalmente sostenibles ("biotecnología para las nuevas biorrefinerías de la lignocelulosa"). Estos estudios se realizan desde dos puntos de vista complementarios: i) más básicos, como la caracterización bioquímica y molecular de las enzimas; y ii) más aplicados, relacionados con el uso de hongos y/o enzimas en diferentes aplicaciones industriales y medioambientales. Los estudios en curso, desarrollados en diferentes proyectos nacionales (incluyendo un proyecto CENIT sobre bioetanol, liderado por Abengoa-Bioenergía) y europeos (incluyendo el proyecto BIORENEW sobre biocatalizadores industriales, coordinado por el CSIC), así como contratos con empresas, incluyen: i) búsqueda de nuevas oxidoreductasas ligninolíticas (peroxidasas, lacasas y oxidasas) y estudios estructura-función de estas enzimas; ii) nuevas esterasas con alta afinidad sobre triglicéridos y ésteres de esteroides; iii) diseño de biocatalizadores "a la carta" para la obtención de productos de valor añadido a partir de polímeros vegetales renovables; y iv) optimización de la producción de bioetanol a partir de grano, y obtención de bioetanol de segunda generación (incluyendo



Fig. 1. Imagen al microscopio electrónico de barrido de hifas de un hongo basidiomiceto creciendo en un radio parenquimático de madera de eucalipto.

Scanning microscopy image of fungal basidiomycete hyphae growing inside a parenchymatic radius of eucalyptus wood.

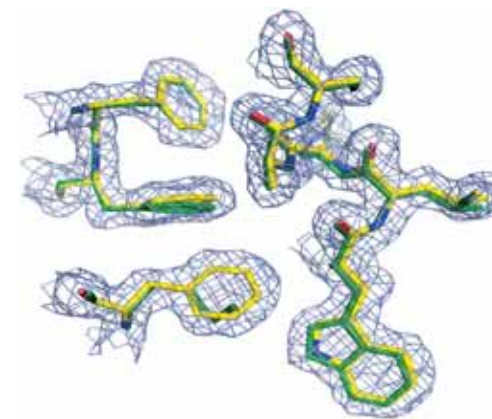


Fig. 2. Detalle de la estructura de la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii* (amarilla) y la variante M247F obtenida por mutagénesis dirigida (verde).

Structural detail of a versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* (yellow) and the M247F variant obtained by site-directed mutagenesis (green).

pretratamientos con hongos y búsqueda de nuevas celulasas). Todos estos estudios pretenden contribuir al uso de la biotecnología microbiana, principalmente en el sector papelero y de los biocombustibles, con el fin de desarrollar procesos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente.

The group has contributed significantly to our understanding of the mechanisms of lignin biodegradation by fungi and their enzymes, as well as that of other recalcitrant compounds of industrial and environmental interest. During recent years we focused our activity on different uses of plant biomass to develop sustainable environmental processes ("biotechnology for new lignocellulose biorefineries"). These studies are being carried out from two different and complementary points of view: i) basic projects on the biochemical and molecular characterization of enzymes; and ii) more applied projects related to the use of fungi and their enzymes in industrial and environmental applications. Our ongoing studies are being developed in the framework of important national projects (such as a CENIT project on bioethanol, coordinated by Abengoa-Bioenergy), international projects (such as the BIORENEW project on industrial biocatalysts, coordinated by the CSIC), and on contracts with companies. These projects involve: i) the study of new ligninolytic enzymes (peroxidases, laccases and oxidases) and their structure-function analyses; ii) the study and applications of new sterol esterases with high affinity for triglycerides and sterol esters; iii) the design of tailor-made biocatalysts and new industrial bioprocesses to obtain products of added value from renewable plant polymers; and iv) the optimization of bioethanol production from cereal grain and the development of second generation bioethanol (including pretreatment of cereal waste with fungi and the search for new cellulases). The aim of the above studies is to promote the use of microbial biotechnology in the paper pulp and biofuel industries, as well as to develop more sustainable and environmentally-friendly bioprocesses.



Publicaciones Seleccionadas | Selected Publications

Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D.S., Schmöll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Cullen, D. (hasta un total de 53 autores) (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 1954-1959.

Rodríguez, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Kooistra, R., Ram, A., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2008). Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel3 encoded protein. **J. Biotechnol.** 134, 9-19.

Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., Mate, M.J., Romero, A., Martínez, M.J., Smith, A.T., and Martínez, A.T. (2008). Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. **Biochemistry** 47, 1685-1695.

Cañas, A., Alcalde, M., Plou, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., and Camarero, S. (2007). Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. **Environ. Sci. Technol.** 41, 2964-2971.

Romero, E., Speranza, A.M., García-Guinea, J., Martínez, A.T., and Martínez, M.J. (2007). An anamorph of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* capable of colonizing and degrading compact disc components. **FEMS Microbiol. Lett.** 275, 122-129.



Patentes | Patents

- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Rencoret, J., Ibarra, D., Speranza, A.M., Camarero, S., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2008). Fecha de prioridad: 30 Junio 2006.
 "Mediator-enzyme system for controlling pitch deposits in pulp and paper production/ Mediator-enzyme system for controlling pitch deposits in pulp and paper production" (patente Española aprobada; solicitudes Europea y USA presentadas)
 Número de solicitud Nacional: ES2282020B1 (aprobada en 2008).
 Número de solicitud Internacional: USA 10080210393, Europea EP 1 908 876 A1 (presentadas en 2008).

- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2008). Fecha de prioridad: 8 Mayo 2008.
 "Peroxidasas mejoradas/Improved peroxidases."
 Número de solicitud Nacional: P200801292.

- Camarero S., Alcalde M., Cañas M.J., Martínez A.T., Martínez M.J., Plou F.J., Ballesteros A., Record E., and Asther M. (2008). Fecha de prioridad: 21 Noviembre 2008.
 "Lacasas de alto potencial redox obtenidas por evolución dirigida/High redox-potential laccases obtained by directed evolution".
 Numero de solicitud Nacional: P200803322.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=3>

CSIB

ÍNDICE



Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad Genetics and Experimental Models of Disease

Patricio Aller	62
José Ignacio Casal	64
María de los Angeles García Pardo	66
Miguel Ángel Peñalva y Eduardo A. Espeso	68
Eduardo Rial	70
Santiago Rodríguez de Córdoba	72
José M ^a Rojo	74
José M ^a Sánchez Puelles	76
Augusto Silva y Jose A. García Sanz	78
Joaquín Teixidó	80

Mecanismos de Desarrollo, Degeneración y Envejecimiento

Mechanisms in Development, Degeneration and Aging

Ángela Casado	82
Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa	84
Catalina Hernández Sánchez, Teresa Suárez, Patricia Boya	
Ángeles Martín Requero	86
Ofelia García Hermida	

Patología Vascular y Hemostasia Vascular Pathology and Haemostasia

Carmelo Bernabeu y Luisa María Botella	88
Eduardo Páez Abril	
Santiago Lamas	90
Roberto Parrilla	92
Matilde Sánchez Ayuso	
Consuelo González Manchón	94

Presentación

Medicina Celular y Molecular

El objetivo último del Programa es contribuir a un conocimiento mejor y más completo de la fisiopatología humana y utilizar este conocimiento para desarrollar estrategias que prevengan o curen la enfermedad.

La investigación en el programa de Medicina Celular y Molecular se ha estructurado en tres subprogramas: El subprograma de Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad aprovecha estas importantes estrategias de la investigación biomédica para profundizar en las bases moleculares de la patología, para identificar dianas terapéuticas y para implementar estrategias de alto rendimiento encaminadas al descubrimiento de nuevos fármacos. El subprograma Mecanismos de Desarrollo, Degeneración y Envejecimiento centra su investigación sobre estos procesos para entender los mecanismos patogénicos de enfermedades, como la Retinosis Pigmentaria o el Alzheimer, y para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas. Finalmente, el subprograma de Patología Vascul y Hemostasia tiene como objetivo entender los procesos moleculares y celulares implicados en enfermedades específicas relacionadas con la pared vascular y el miocardio o con estados alterados de la hemostasia.

El Programa anima a establecer colaboraciones entre subprogramas, y con otros programas en el CIB, para desarrollar una investigación biomédica interdisciplinaria de alta calidad que aumente la competitividad internacional de los grupos de investigación individuales. El Programa busca la incorporación de nuevos procesos tecnológicos e infraestructuras experimentales, y apoya el desarrollo de investigaciones pioneras en biomedicina mediante la incorporación de investigadores jóvenes brillantes. El Programa también apoya las iniciativas de transferencia de tecnología y anima a la creación de valor añadido para la investigación translacional, protegiendo adecuadamente los resultados y reactivos científicos producidos por los grupos de investigación. Ese valor añadido ha dado ya lugar a la generación de empresas *spin-off* dentro del Programa y facilitará la creación de otras en el futuro.

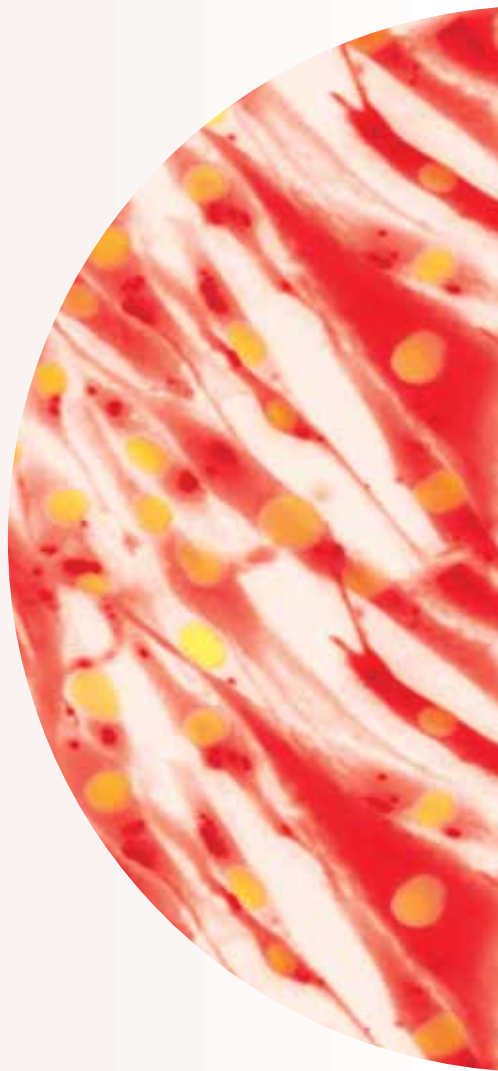
Overview

Cellular and Molecular Medicine

The main scientific goal of this Programme is to better understand human physiopathologies and to develop translational approaches towards preventing and treating disease.

The research carried out under the Cellular and Molecular Medicine programme has been structured into three subprogrammes: The subprogramme of Genetic and Experimental Models of Disease takes advantage of these important approaches to understand pathogenic mechanisms, to identify therapeutic targets and to implement high-throughput strategies for drug discovery. The groups integrated in the Mechanisms in Development, Degeneration and Aging subprogramme focus their research on the involvement of these processes in the pathogenesis of human disorders like Retinitis Pigmentosa or Alzheimer's disease, and on the development of diagnostic and therapeutic strategies. Finally, the Vascular Pathology and Hemostasia subprogramme aims to understand the molecular and cellular processes involved in specific diseases related to the vascular wall and the myocardium, or associated with altered states of hemostasia.

Collaborations between these subprogrammes and other research programmes at the CIB are encouraged, to strengthen the high quality interdisciplinary biomedical research carried out at our Institute, and to increase the international competitiveness of the individual research groups. The Programme seeks to incorporate the latest technological developments and experimental infrastructures, and to promote novel pioneering research by attracting bright young research groups in the area of Biomedicine. The Programme also promotes technological transfer initiatives and it encourages the adequate protection of the scientific results and reagents produced by the individual groups. This added value has already resulted in the generation of spin-off biotech companies by groups within the Programme and it will facilitate the creation of additional ones in the future.





Patricio Aller Tresguerres
 Profesor de Investigación
 aller@cib.csic.es

Ph.D., 1979.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral, Department of Pathology, 1983
 Temple University, Philadelphia, USA.
 Profesor Titular, 1985.
 Universidad de Córdoba.
 Científico Titular y Jefe de Grupo, 1986.
 CIB, CSIC.
 Investigador Científico, 2002.
 CIB, CSIC.
 Profesor de Investigación, 2009.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Donna Amrán Cohen
 Elena de Blas Brotons
 Carlos Fernández Sáez
 Yolanda Sánchez Delgado
 Gloria Pilar Simón García de Mora

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
 Genetics and Experimental Models of Disease

Mecanismos de Acción de Drogas Antitumorales

Mechanisms of Action of Antitumour Drugs

El laboratorio se constituyó hace aproximadamente dieciocho años, para el estudio de aspectos relativos al control de la diferenciación, muerte, y respuesta de estrés celular. Nuestro interés actual se centra en los mecanismos de regulación de la muerte celular (apoptosis y necrosis) inducida por agentes antitumorales, especialmente drogas con diana directa en la mitocondria ("mitochondriotoxics"), y en el diseño de estrategias que podrían mejorar su eficacia clínica.

This laboratory was established approximately eighteen years ago with the aim of investigating aspects of the control of cell differentiation, cell death and the stress response. Our present interests mainly focus on the mechanisms that regulate cell death induced by anti-tumour agents (apoptotic and necrotic), especially mitochondrial-targeting drugs ("mitochondriotoxics"), and on designing strategies that might improve their clinical efficacy.

Nuestro interés se ha centrado especialmente en la acción del trióxido de arsénico (ATO, Trisenox™), droga usada clínicamente frente a la leucemia promielocítica aguda (PML), y objeto de gran investigación frente a otras neoplasias. No obstante, analizamos también la acción de otras drogas mitocondriotóxicas como la lonidamina, ya utilizada frente algunos tumores sólidos, y agentes catiónicos lipofílicos deslocalizados. Como objetivo general, intentamos diseñar estrategias de sensibilización que incrementen la eficacia apoptótica de estos compuestos, permitiendo reducir sus dosis efectivas y por ello su toxicidad colateral. Entre otros aspectos, investigamos: (1) Acción quimio-sensibilizadora (pro-apoptótica) de agentes fenólicos dietéticos (p.e., flavonoides), y otros agentes tales como inhibidores del proteasoma y de histonas deacetilasas. (2) Correlación entre potenciación de apoptosis y estrés oxidativo, medido por sobre-producción de especies reactivas de oxígeno y alteraciones en glutatión intracelular, y acción protectora de agentes anti-oxidantes. Asimismo, posible influencia de alteraciones en actividad glucolítica. (3) Señalización por proteínas quinasas tales como JNK y p38-MAPK, ruta Raf-1/MEK/ERK, ruta PI3K/Akt, AMPK, y efecto de moduladores farmacológicos de estas quinasas; y alteraciones en NF-κB y genes bajo su regulación. (4) Mecanismos de activación/ejecución de la muerte celular, incluyendo estrés de retículo endoplásmico, activación de la vía apoptótica intrínseca (mitocondrial) y secundariamente extrínseca (mediada por receptor), y selección entre muerte apoptótica y necrótica. Empleamos modelos de células leucémicas humanas mieloides (p.e., U937, HL60, NB4) y linfoides (p.e., Jurkat), y recientemente modelos derivados de tumores sólidos - p.e., PC3 y LNCaP, de origen prostático con distinto grado de malignidad, y hepatocarcinoma HepG2.

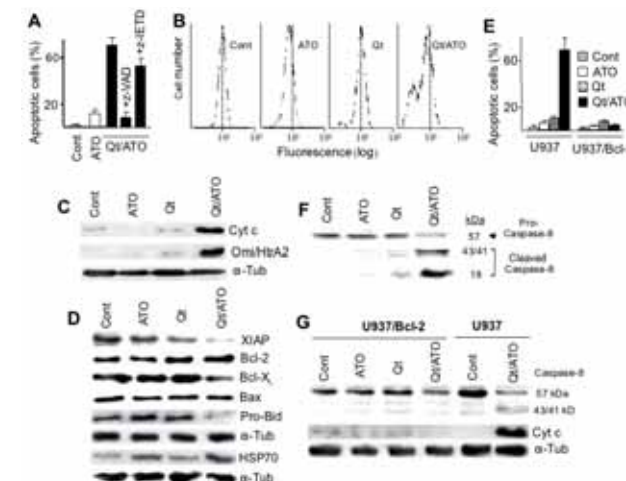


Fig. 1. El flavonol quercetina (Qt) potencia la acción apoptótica del agente anti-leucémico trióxido de arsénico (ATO). La figura muestra que el cotratamiento con 10 μM de quercetina, en sí mismo escasamente tóxico, incrementa notablemente la frecuencia de apoptosis producida por 2 μM ATO, en células leucémicas mieloides agudas humanas U937, incremento que es prevenido por el inhibidor de pan-caspasas z-VAD-fmk (A). La apoptosis así producida se ejecuta a través de la vía "intrínseca" (mitocondrial), como se prueba por la disipación de potencial de membrana mitocondrial, ΔΨm (B); extrusión de proteínas mitocondriales citocromo c y Omi/HtrA2, medido por su aparición en fracción citosólica (C); reducción de niveles totales de XIAP y Bcl-XL (D); y supresión de la apoptosis por transfección de bcl-2 (células U937/Bcl-2) (E). El incremento de apoptosis implica también activación de caspasa-8, medida por su rotura proteolítica (F), y activación de Bid, medida rotura/desaparición de su pro-forma (D). No obstante la activación del eje caspasa-8/Bid parece ser un efecto secundario derivado de la vía mitocondrial, dado que la rotura/activación de la caspasa se suprime por sobre-expresión de Bcl-2 (G).

The flavonol quercetin (QT) potentiates the apoptosis induced by the anti-leukaemic agent arsenic trioxide (ATO). The figure shows that co-treatment with 10 μM quercetin, almost innocuous in itself, greatly increases the apoptosis induced by 2 μM ATO in U937 acute human myeloid leukaemia cells, which is in turn abrogated by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (A). Quercetin plus ATO-induced apoptosis is executed through the "intrinsic" (mitochondrial) pathway, as shown by: the dissipation of mitochondrial transmembrane potential, ΔΨm (B); the extrusion of the mitochondrial proteins cytochrome c and Omi/HtrA2, measured in the cytosolic fraction (C); the reduction of total XIAP and Bcl-XL levels (D); and abrogation of apoptosis by bcl-2 transfection (U937/Bcl-2 cells) (E). Apoptosis potentiation also involves caspase-8 activation, as measured by proteolytic cleavage, and Bid activation, as evident through the cleavage/disappearance of the pro-form (D). Nonetheless the activation of the caspase-8/Bid axis seems to be a secondary event derived from the mitochondrial pathway, since caspase-8 cleavage is inhibited by Bcl-2 over-expression (G).



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Ramos, A.M., and Aller, P., (2008). Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukaemic agent arsenic trioxide in human leukaemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1912-1923.

Sánchez, Y., Amrán, D., de Blas, E., and Aller, P., (2008). Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4). Protein kinase modulation and reactive oxygen species generation. *Biochem. Pharmacol.* DOI: 10.1016/j.bcp.2008.10.035. (En prensa/In press).

Sánchez, Y., Amrán, D., Fernández, C., de Blas, E., and Aller, P., (2008). Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cell lines via reactive oxygen species (ROS) generation and activation of ROS-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int. J. Cancer* 123, 1205-1214.

Amrán, D., Sánchez, Y., Fernández, C., Ramos, A.M., de Blas, E., Bréard, J., Calle, C., and Aller, P., (2007). Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNFα-induced apoptosis via p38-MAPK-regulated activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways. *Biochim. Biophys. Acta* (Mol. Cell. Res.) 1773, 1653-1663.

Quiroga, A.G., Cubo, L., de Blas, E., Aller, P., and Navarro-Ranninger, C., (2007). Trans platinum complexes design: One novel water soluble oxime derivative that contains aliphatic amines in trans configuration. *J. Inorg. Biochem.* 101, 104-110.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=13



José Ignacio Casal Álvarez

Investigador Científico
icasal@cib.csic.es

PhD, Centro de Biología Molecular, 1984.
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.

Post-doctoral Fellow, (1985-1986)
Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge,
MA, USA.

Jefe de Proyecto, (1986-1997).
INGENASA.

Director de Investigación, (1997-2001).
INGENASA.

Director Programa de Biotecnología, (2001-2008).
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), ISCIII.

Investigador Científico, 2007.
CSIC.

Incorporación, 2008.
CIB.

Otros Miembros | Other lab Members:

Rodrigo Barderas
Iván Cristobo
Ingrid Babel

Genética y Modelos Experimentales de
Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

Proteómica Funcional Functional Proteomics

Nuestro laboratorio esta interesado en la aplicación de tecnologías proteómicas a la identificación de biomarcadores diagnósticos en cáncer; el estudio de los mecanismos implicados en la transición epitelio-mesénquima, la progresión tumoral y la caracterización del proceso de metástasis en cáncer colorrectal.

Our laboratory is interested in identifying diagnostic biomarkers for neoplastic diseases through proteomic techniques, as well as studying the mechanisms involved in the epithelial-mesenchymal transition, tumour progression and metastasis in colorectal cancer. In addition, we use phage-display technologies to generate peptide and antibody libraries in order to develop new and innovative therapeutic agents for cancer.

Nuestra investigación actual se centra en tres líneas principales:
Identificación de marcadores diagnósticos en cáncer colorrectal mediante detección de autoanticuerpos y análisis proteómico diferencial cuantitativo. Existen claras evidencias de la existencia de una respuesta inmune a cáncer en humanos, como ha demostrado la presencia de autoanticuerpos en sueros tumorales. Las propias proteínas (autoantígenos) pueden sufrir alteraciones durante el desarrollo de un tumor debido a mutaciones puntuales, plegamientos erróneos, modificaciones aberrantes, truncamientos, degradaciones o diferentes combinaciones de estos factores. Se sabe poco sobre las consecuencias del reconocimiento inmune de estos productos génicos alterados, a pesar de su gran relevancia potencial en autoinmunidad e inmunidad tumoral. Nuestro grupo esta trabajando en la definición de estos antígenos asociados a tumores (AATs) específicos para cáncer colorrectal utilizando tecnología de microarrays de proteínas y la caracterización de los mecanismos que subyacen la inducción de la respuesta de anticuerpos frente a tumores, tipos de mutaciones presente en los AATs, procesamiento intracelular de las proteínas mutadas y las diferentes opciones para utilizar esta respuesta para la inmunoterapia del cáncer. Asimismo, estamos utilizando un análisis cuantitativo proteómico diferencial avanzado (SILAC) para estudiar y caracterizar el proteoma de dos líneas celulares de colon, KM12C y KM12SM, que difieren en propiedades metastáticas. La idea es identificar proteínas predictoras de recidivas e inmunomoduladores implicados en metástasis.

Estudio de la transición epitelio-mesénquima en cáncer de colon. El proceso de invasividad tumoral va acompañado por cambios en la morfología celular. Las células tumorales pierden sus características epiteliales y adquieren un fenotipo fibroblástico durante un proceso llamado transición epitelio-mesénquima. Actualmente estamos estudiando las alteraciones proteómicas inducidas por factores clave en la regulación de la proliferación celular y el fenotipo epitelial como SNAIL o la Vitamina D.

Desarrollo de anticuerpos humanos recombinantes anti-tumorales. Nuestro grupo esta interesado en el traslado de las dianas identificadas a productos de relevancia clínica. Hemos desarrollado diferentes estrategias para la producción de anticuerpos humanos frente a FGFR3, gastrina y otros oncogenes con la idea de desarrollar nuevas inmunoterapias basadas en anticuerpos frente a dianas tumorales.

Our current research is mainly centred along three lines:
Identification of diagnostic markers in colorectal cancer through autoantibody detection and quantitative differential proteomic analysis. There is growing evidence of the existence of an immune response to cancer in humans, as demonstrated by the presence of autoantibodies in cancer sera. Self-proteins (autoantigens) may be altered during tumour formation by specific point mutations, misfolding, aberrant modifications, truncations, degradation or different combinations of these events. Little is known about the consequences of immune recognition of altered gene products, despite their potential relevance to autoimmunity and tumour immunity. Our group is working on the identification of specific tumour-associated antigens (TAAs) for colorectal cancer by using protein microarrays. We are also characterizing the mechanisms underlying the induction of the antibody response against tumours, the types of mutations present in the TAAs, the intracellular fate of the mutated proteins and the options to use this response for cancer immunotherapy. In addition, to search for predictors of cancer recurrence and immunomodulators of metastasis, we employ advanced quantitative proteomic differential analysis (SILAC) to study and characterize the proteome of two colon cell lines, KM12C and KM12SM, which differ in their metastatic properties.

Study of the epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. The invasion process in cancer is accompanied by changes in cell morphology. Cancer cells lose the epithelial characteristics and acquire a fibroblast phenotype through the epithelial-mesenchymal transition. Currently, we are studying proteomic alterations induced by key factors in the regulation of cell proliferation and the epithelial phenotype, such as SNAIL or 1,25 dihydroxyvitamin D3.

Development of anti-tumour human recombinant antibodies. Our group is interested in the translation of the targets identified into clinically relevant products. We have developed different strategies for the production of human and mouse antibodies against FGFR3, gastrin and other oncogenes with the aim of developing antibody-based immunotherapies for cancer.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Alfonso, P., Cañamero, M., Fernández Carbonie, A., Nuñez and Casal, J.I. (2008). Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labelling. *J. Proteome Res.* 7, 4247-4255.

Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., and Casal, J.I. (2008). Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9029-9034.

Martínez-Torrecuadrada, J.L., Cheung, L.H., López-Serra, P., Barderas, R., Cañamero, M., Ferreiro, S., Rosenblum, M.G., and Casal, J.I. (2008). Anti-tumor activity of FGFR3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma. *Mol. Cancer Therap.* 7, 862-873.

Casado-Vela, J., Ruiz, E.J., Nebreda, A.R., and Casal, J.I. (2007). A combination of neutral loss and selected ion monitoring with two enzymatic digestions enables a comprehensive mapping of phosphorylation sites. *Proteomics.* 7, 2522-2529.

Madoz-Gurpide, J., Cañamero, M., Sánchez, L., Solano, J., Alfonso, P., and Casal, J.I. (2007). A proteomic analysis of cell signalling alterations in colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2150-2164.

Ver más en: www.cib.csic.es/grupo.php?idgrupo=66

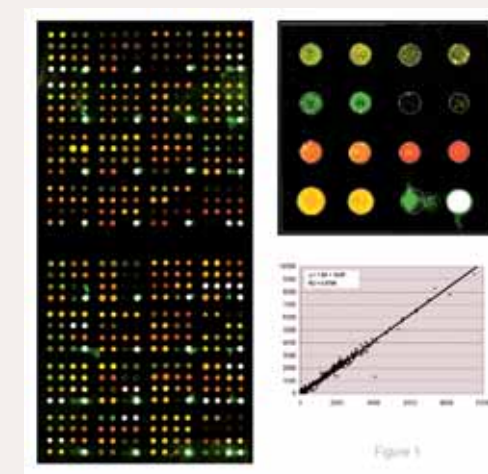


Fig. 2. Imagen representativa de un microarray de anticuerpos incubado con cantidades iguales de un extracto proteico correspondiente a una biopsia de CCR marcada con Alexa Fluor 647 y su correspondiente extracto de mucosa normal marcado con Alexa Fluor 555.

Representative image of an antibody microarray incubated with equal amounts of a CRC biopsy extract labelled with Alexa Fluor 647 and its corresponding normal mucosa extract labelled with Alexa Fluor 555. See Madoz-Gurpide et al. (2007). See *Mol. Cell Proteomics* 6, 2150-2164, for details.

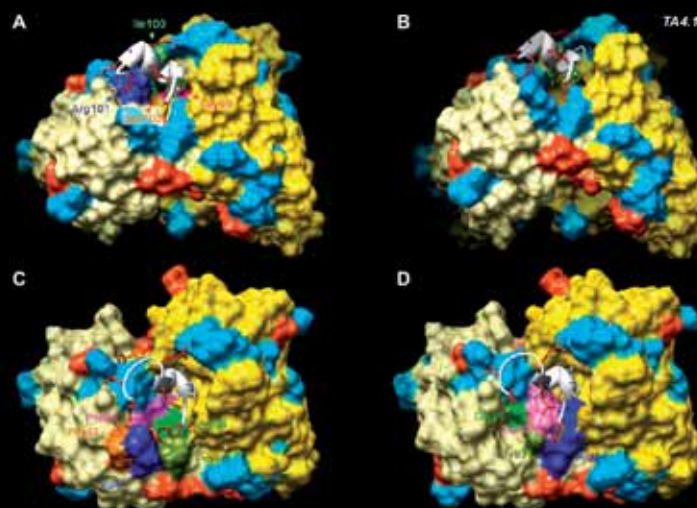
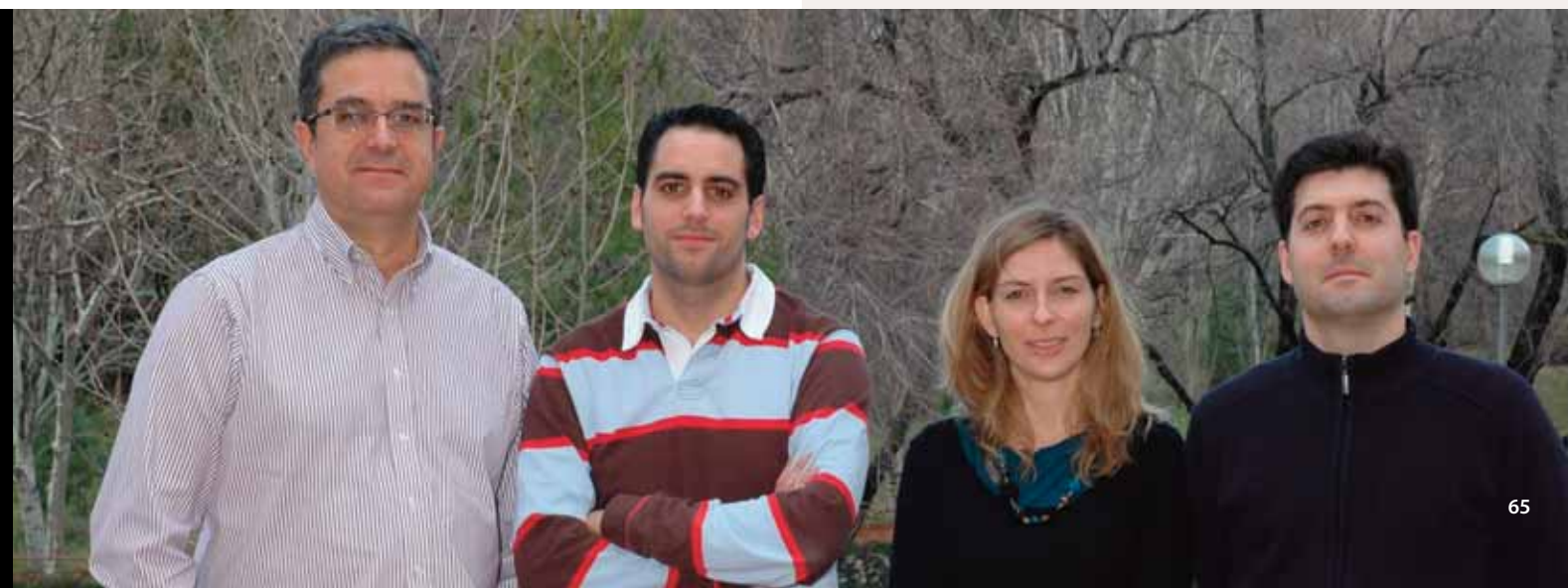


Fig. 1. Modelado de la interacción entre gastrina 17 y scFvs
Modelling of the interaction between gastrin 17 and scFvs.
See Barderas et al. (2008). See *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9029-9034, for details.





María de los Angeles García Pardo
Profesora de Investigación
agarcia@ciib.csic.es

Ph.D. Fundación Jiménez Díaz, 1976.
Universidad Complutense de Madrid.
Assistant Research Scientist, 1974-1976.
New York University Medical Center, NY, USA.
Research Associate, 1977.
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.
Research Associate, 1978.
New York University Medical Center, NY, USA.
Adjunta, 1978-1981. Fundación Jiménez Díaz, Madrid.
Research Assistant Professor, 1981-1986.
New York University Medical Center, NY, USA.
Assistant Investigator, 1986-1989.
The New York Blood Center, NY, USA.
Assistant Professor 1990. Columbia University, USA.
Científica Titular, 1987. Incorporación CIIB, 1991.
Investigadora Científica, 1993.
CIIB, CSIC.
Profesora de Investigación, 2007.
CIIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Elizabeth Escobar Díaz
Mercedes Hernández del Cerro
Alfredo Maqueda Fernández
Javier Redondo Muñoz
Estefanía Ugarte Berzal

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

Adhesión Celular en el Sistema Inmune Cell Adhesion in the Immune System

Un objetivo esencial del laboratorio ha sido el estudio de las interacciones celulares con la matriz extracelular, en particular fibronectina, la regulación de la activación de integrinas, y la señalización intracelular mediada por integrinas. También estamos estudiando el papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y de otras moléculas que participan en procesos de adhesión y migración, en algunas patologías de células B, fundamentalmente la leucemia linfática crónica B (LLC-B).

The laboratory mainly studies cellular interactions with the extracellular matrix (ECM), particularly with fibronectin, as well as the regulation of integrin activation and their intracellular signalling pathways. We also study the role of the $\alpha 4\beta 1$ integrin and other molecules involved in adhesion and migration events associated with certain B-cell malignancies, mostly B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL).

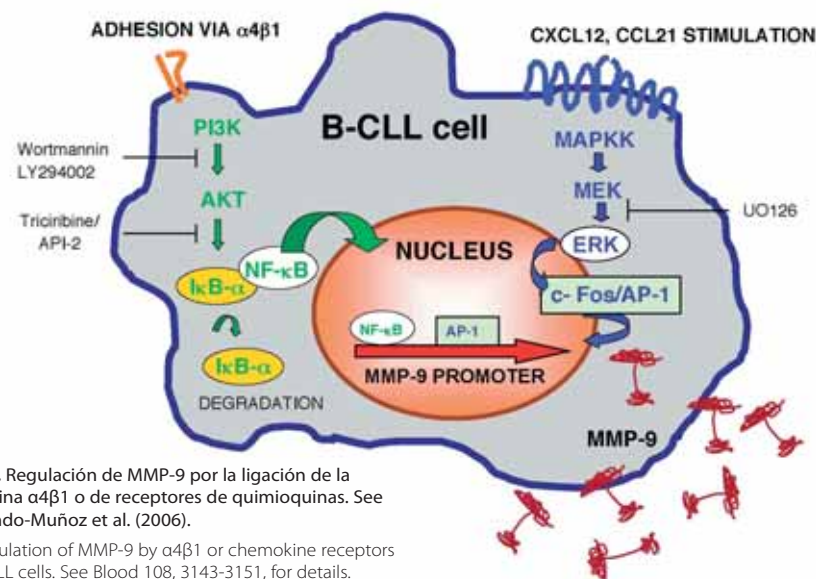


Fig. 1. Regulación de MMP-9 por la ligación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ o de receptores de quimioquinas. See Redondo-Muñoz et al. (2006).
Upregulation of MMP-9 by $\alpha 4\beta 1$ or chemokine receptors in B-CLL cells. See Blood 108, 3143-3151, for details.

Matrices de fibronectina. La matriz extracelular (MEC) es esencial para la adhesión, migración, diferenciación y crecimiento celular. Las fibras de fibronectina (Fn) son un componente esencial de la MEC y se forman por interacciones entre dominios específicos de Fn. Este proceso es complejo y está altamente regulado. Utilizando ensayos de unión y de ensamblaje de matriz, hemos identificado una nueva región de Fn implicada en fibrillogénesis. Esta región está en un dominio de unión a heparina y proteoglicanos y es aparentemente críptica. La correcta formación de matrices de Fn es esencial para el comportamiento normal de la célula, siendo típica su ausencia o alteración en muchas patologías como el carcinoma renal, como nuestros estudios han demostrado.

Leucemia linfática crónica. Nuestro objetivo es caracterizar los mecanismos implicados en la progresión de la LLC-B, la leucemia más común en países occidentales. En concreto estudiamos: 1) moléculas implicadas en adhesión y migración, particularmente la metaloproteína de matriz-9 (MMP-9); moléculas que contribuyen a la supervivencia de las células malignas; 3) nuevos agentes inductores de apoptosis que pudieran servir para el tratamiento de la LLC-B.

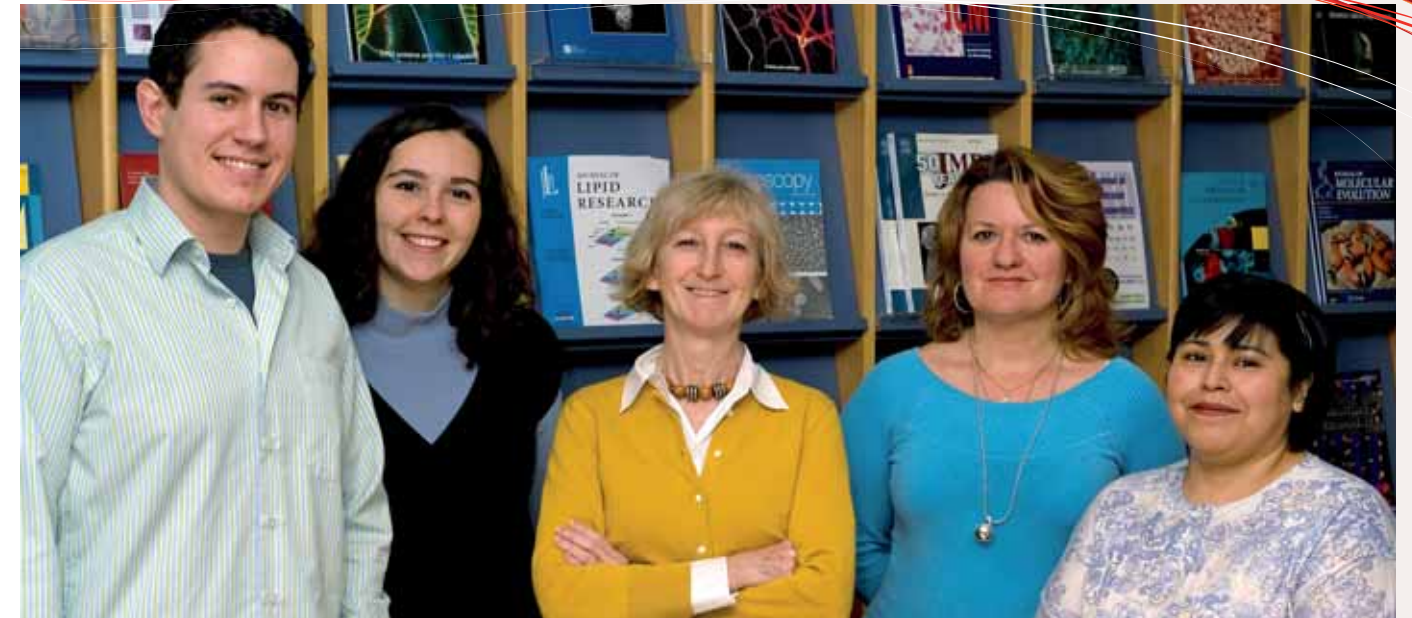
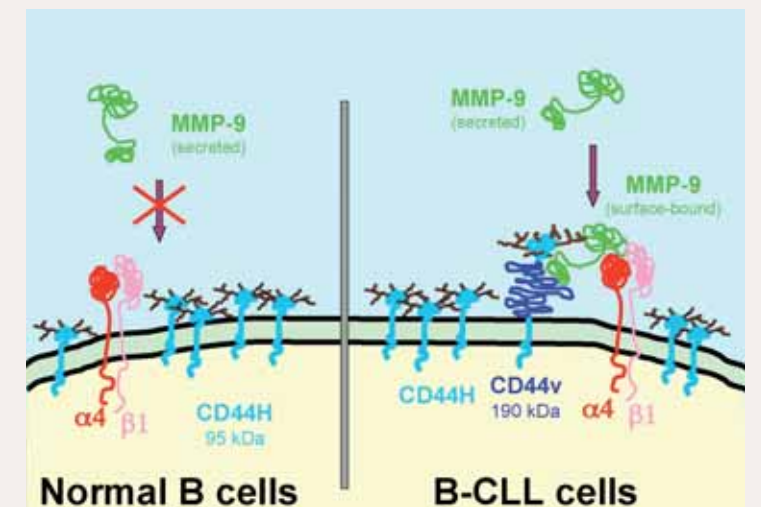


Fig. 2. Modelo propuesto para explicar la presencia de MMP-9 en la superficie de células LLC-B. See Redondo-Muñoz et al. (2008).
Proposed model for the presence of MMP-9 at the B-CLL cell surface. See Blood 112: 169-178, for details.

Recientemente hemos mostrado que la ligación de la integrina $\alpha 4\beta 1$, CXCR4 o CCR7 regulan MMP-9 positivamente (Fig. 1) y que MMP-9 juega un papel clave en la migración de células LLC-B. MMP-9 está presente en la membrana de células LLC-B y une $\alpha 4\beta 1$ y CD44v (Fig. 2). Actualmente estudiamos las consecuencias funcionales de estas interacciones, así como el papel de MMP-9 en la patología de la LLC-B mediante estudios in vivo en ratones.

Fibronectin matrix. The ECM is essential for cell adhesion, migration, differentiation and growth. Fibronectin (Fn) fibrils are a major component of the ECM and are formed by Fn-Fn interactions through specific domains. This is a complex and highly regulated process and it is still not fully understood. Using binding and matrix assembly assays, we have identified a novel Fn region involved in fibrillogenesis that is located in a heparin and proteoglycan-binding domain, and which appears to be cryptic. Proper formation and regulation of Fn matrices is crucial for normal cell behaviour and as we have shown, altered or absent matrix assembly is typical in many pathologies including renal carcinoma.

Chronic lymphocytic leukemia. Our general aim is to characterize the mechanisms involved in the progression of B-CLL, the most common leukaemia in Western countries. We focus on the following aspects: 1) molecules involved in cell adhesion and migration, particularly matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); 2) molecules contributing to the survival of the malignant cells; 3) novel apoptosis-inducing compounds that might be useful for the clinical treatment of B-CLL. We have recently shown that MMP-9 is upregulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin, CXCR4 or CCR7 engagement (Fig. 1), and that it plays a key role in B-CLL migration. Moreover, MMP-9 is present at the B-CLL cell surface and it binds the $\alpha 4\beta 1$ integrin and CD44v (Fig. 2). We are currently studying the functional consequences of the interaction of MMP-9 with its surface receptors. The contribution of MMP-9 to the pathology of B-CLL is also being approached through in vivo studies in mice.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Feijoo-Cuaresma, M., Méndez, F., Maqueda, A., Esteban, M.A., Naranjo-Suárez, S., Castellanos, M.C., Hernández del Cerro, M., Vázquez, S.N., García-Pardo, A., Calzada, M.J., and Landázuri, M.O. (2008). Inadequate activation of the GTPase RhoA contributes to the lack of fibronectin matrix assembly in von Hippel-Lindau protein defective renal cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 24982-24990.

Redondo-Muñoz, J., Terol, M.J., García-Marco, J.A., and García-Pardo, A. (2008). MMP-9 is upregulated by CCL21/CCR7 interaction via ERK1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-CLL cell invasion and migration. *Blood* 111, 3833-386.

Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., García-Marco, J.A., Hernández del Cerro, M., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Terol, M.J., and García-Pardo, A. 2008. $\alpha 4\beta 1$ integrin and 190 kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase-B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 112, 169-178.

Maqueda, A., Moyano, J.V., Peters, D.M., and García-Pardo, A. (2007). The heparin III-binding domain of fibronectin (III4-5 repeats) binds to fibronectin and inhibits fibronectin matrix assembly. *Matrix Biol.* 26, 642-651.

Ver más en: www.ciib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=24



Miguel Ángel Peñalva

Profesor de Investigación
penalva@cib.csic.es

Ph.D. 1982. Universidad Autónoma de Madrid.
Postdoctoral, Antibióticos SA (Madrid) e Institut de Genetique et Microbiologie, Universidad de Paris, Orsay.
Científico Titular y Jefe de grupo, 1987. CIB, CSIC.
Profesor de Investigación desde 2001.
Visiting Scientist. (2005-2006).
MRC Laboratory of Molecular Biology (Cambridge UK).
Elegido miembro de EMBO en 2000.



Eduardo A. Espeso Fernández

Científico Titular
eespeso@cib.csic.es

Ph.D. 1989. Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, (1997-1999). Imperial College London.
EMBO-Postdoctoral Fellow. Contratado 'Ramón y Cajal', (2001-2004). CIB.
Científico Titular y Jefe de grupo, 2004. CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- América Hervás-Aguilar
- Areti Pantazopoulou
- Juan Francisco Abenza
- Antonio Galindo
- Ane Marquina
- Elena Reoyo
- Olga Rodríguez-Galán
- Lidia Araujo Bazán
- Oier Etxebeste Juárez
- Javier Fernández Martínez
- Erika Herrero García
- Laura Mellado Maroñas

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

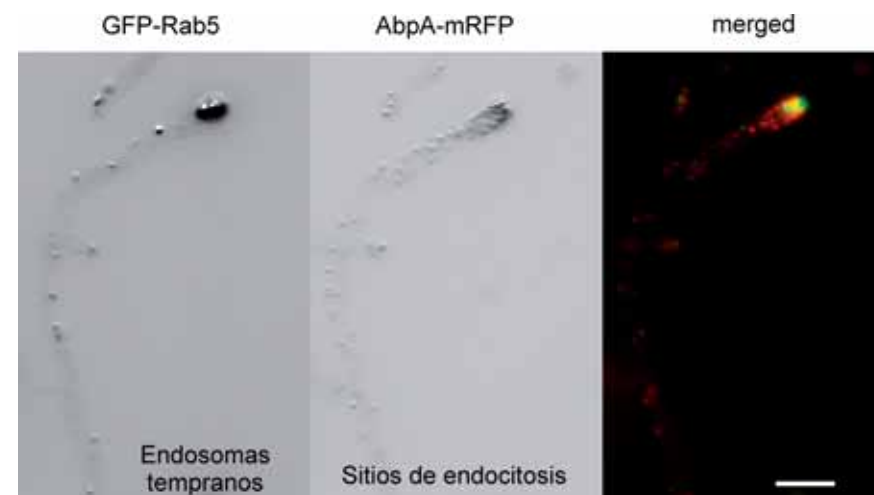
Genética Molecular de *Aspergillus* *Aspergillus* Molecular Genetics

***A. nidulans* es pariente cercano del devastador patógeno fúngico *A. fumigatus*.** Las células del extremo de las hifas crecen exclusivamente por extensión apical, formando células tubulares multinucleadas donde el tráfico intracelular se supedita a las relativamente grandes distancias existentes entre regiones distales y apicales o entre diferentes núcleos de la célula. La regulación de la transcripción por pH ambiental media la adaptación de los hongos a ambientes con distinto pH.

***A. nidulans* is closely related to the devastating fungal pathogen *A. fumigatus*.** Hyphal tip cells grow exclusively by apical extension, leading to tubular multinucleated cells where intracellular traffic is tailored to the needs imposed by the relatively large distances between apical and distal regions and between the different nuclei of the cell. Regulation of gene expression by ambient pH mediates fungal adaptation to environments with different values of pH.

La regulación por pH ambiental, crucial para la patogenicidad fúngica, implica al factor transcripcional PacC y a seis proteínas componentes de la ruta de señalización por pH: el receptor 7-TMD PalH, la arrestina PalF, el auxiliar PalI y tres interactores de ESCRT-III: PalA, PalC y la proteasa 'calpain-like' PalB. Estudiamos cómo la activación del complejo 7-TMDR/arrestina PalF conecta con las proteínas Pal que funcionan aguas abajo y cómo éstas reclutan ESCRT-III, organizando dominio especializado de membrana donde PacC se activa proteolíticamente. Característica de los hongos patógenos es su invasividad, asociada con su rápida extensión apical, dependiente del tráfico intracelular. Caracterizamos los mecanismos determinantes de identidad de membranas en la ruta endocítica y el Golgi, dependientes de lípidos y GTPasas Rab organizadoras de dominios en membranas

El transporte activo macromolecular entre núcleo y citoplasma sucede a través de los complejos del poro nuclear de manera dependiente de GTPasa Ran y carioferinas. Éstas reconocen motivos aminoacídicos en sus cargos y presentan localizaciones subcelulares relacionadas con su papel fisiológico. Hipotetizamos que el transporte núcleo-citoplásmico difiere entre células mono y multinucleadas. Mientras la maquinaria central está conservada, las células multinucleadas han adquirido componentes que coordinan el transporte de cargo a los diferentes núcleos y aseguran que los estímulos lleguen a éstos en tiempos con significado biológico. Caracterizamos la dotación completa de carioferinas de *A. nidulans* usando factores transcripcionales como cargos prototipo. De ellos estudiamos su activación, distribución celular y transporte estímulo-dependiente a los núcleos.



Regulation of gene expression by ambient pH is crucial for fungal pathogenicity. It involves the PacC transcription factor and six proteins in the ambient pH signalling pathway: the 7-TMD receptor PalH; the positively-acting arrestin PalF; the helper PalI; and three proteins that bind ESCRT-III (PalA, PalC and the calpain-like protease PalB). We are studying how PalH 7-TMD receptor/PalF arrestin activation is connected to the Pal proteins that act downstream, and how the latter recruit ESCRT-III to organise a specialised membrane domain where proteolytic processing and activation of PacC occurs. A key feature of pathogenic fungi is their invasiveness, associated with rapid apical extension, which is highly dependent on intracellular trafficking. We are characterising the mechanisms that determine membrane identity in the endocytic pathway and Golgi compartments by characterising membrane domain-organising lipids and Rab GTPases.

Macromolecular transport between the nucleus and the cytoplasm occurs through the nuclear pore complexes in the nuclear envelope via Ran GTPase- and karyopherin-dependent processes. Karyopherins recognise amino acid sequence motifs in their protein cargoes and display subcellular localisations related to their physiological role. We hypothesise that nuclear transport in mono- and multi-nucleated cells differs, such that while the core machinery is conserved, multinucleated cells evolved specific components to coordinate cargo transport into the different nuclei and to ensure



that environmental stimuli reach them in a biologically meaningful timescale. We are characterising the complete set of *A. nidulans* karyopherins using transcription factors as model cargoes, studying nuclear localisation signals and their activation, as well as their subcellular distribution and their stimulus-dependent transport to the nucleus.

Fig. 1. La 'dynein loading zone' en el tip hifal, por la que los endosomas circulan antes de su movimiento retrógrado, está asociada al anillo subapical de internalización endocítica, marcado con AbpA.

The dynein loading zone in the hyphal tip, through which early endosomes traffic before undergoing retrograde movement, is spatially associated to the AbpA-labelled subapical endocytic internalisation ring. See Abenza et al. (2009) Traffic 10: 57-75 for details.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Hervás-Aguilar A, Rodríguez J M, Tilburn J, Arst H N, Jr., Peñalva M A. (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J. Biol. Chem.* 282: 34735-34747.

Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Vincent, O., Arst, H.N., Jr., Tilburn, J. and Peñalva, M.A. (2007) PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signaling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* 8: 1346-1364.

Araujo-Bazán L, Peñalva M A, and Espeso E A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 67: 891-905.

Peñalva, M.A., Tilburn J., Bignell E. and Arst, H.N. Jr. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16: 291-300.

Spievogel A, Findon H, Arst H N, Jr., Araujo-Bazán L, Hernández-Ortiz P, Stahl U, Meyer V and Espeso E A. (2008). Two zinc finger transcription factors, CrzA and SlrA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 414:419-429.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=8



Fig. 2. Localización nuclear de GFP-PacC en interfase. Durante la mitosis, una fracción de PacC se mantiene asociada a la cromatina de manera dependiente de su capacidad para unir al DNA, mientras que otra parte se escapa al citoplasma.

Nuclear localisation of GFP-PacC in interphase. A proportion of PacC remains chromatin-bound during mitosis, which is dependent on its DNA binding capacity, whereas a fraction of the protein is released into the cytosol. See Araujo-Bazán et al. Fungal Genet Biol. 2008, 45(3):278-91 for details.



Eduardo Rial Zueco
Investigador Científico
rial@cib.csic.es

Ph.D. en Ciencias Biológicas, 1984.
Facultad de Ciencias, Universidad del País Vasco.
Estudiante Doctorado, (1982-1984).
Universidad de Dundee, Escocia.
Research Assistant, (1984-1987).
Universidad de Dundee, Escocia.
Científico Titular, 1988.
CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2004.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Andrea Anedda
María del Mar González Barroso
Luis Alberto Luévano Martínez
Eva Moyano Blázquez
Leonor Rodríguez Sánchez
Pilar Zaragoza Jiménez

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

Bioenergética Mitocondrial Mitochondrial Bioenergetics

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son transportadores mitocondriales implicadas en procesos tan diversos como la termogénesis adaptativa, la regulación de la secreción de insulina o el control de la producción de especies reactivas del oxígeno. Nuestro grupo investiga el papel fisiológico y regulación de las UCPs y desarrolla nuevos reguladores que podrían utilizarse para tratar patologías como la diabetes o la resistencia a la quimioterapia de células tumorales.

The uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial transporters involved in processes such as the regulation of insulin secretion, adaptive thermogenesis or the control of the production of reactive oxygen species. Our group investigates the physiological role and regulation of the UCPs and works on the development of new regulators that could be used to treat pathologies like diabetes or the chemoresistance of tumour cells.

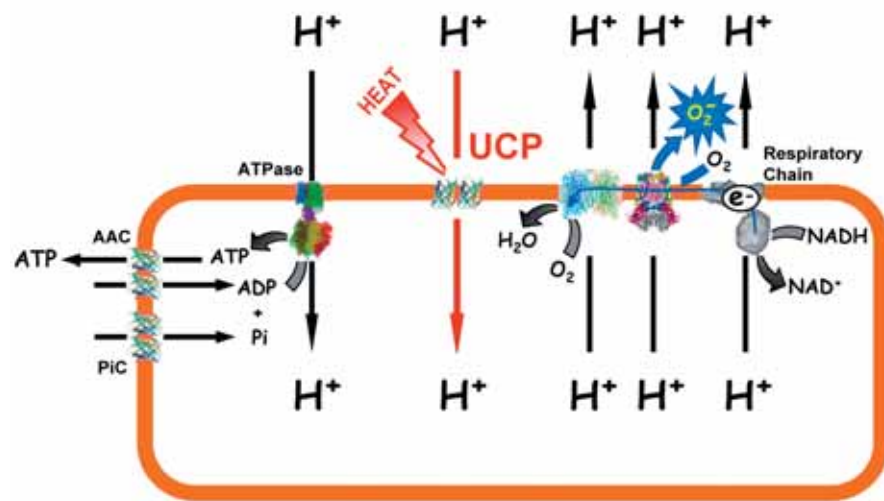


Fig. 1. Las proteínas desacoplantes (UCPs) catalizan la reentrada a la matriz de los protones que han sido bombeados por la cadena respiratoria. La actividad de las UCPs disminuye la eficiencia de la fosforilación oxidativa, disipando la energía del gradiente de protones en forma de calor y reduciendo la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno.

The uncoupling proteins (UCPs) catalyze the reentry into the matrix of the protons that have been pumped by the respiratory chain. The activity of the UCPs lower the energetic efficiency of the oxidative phosphorylation, dissipating the energy of the proton gradient as heat and lowering the mitochondrial production of reactive oxygen species.

Las UCPs disminuyen la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa mitocondrial permitiendo la reentrada a la matriz de los protones bombeados durante la respiración. La UCP1 es exclusiva del tejido adiposo pardo de mamíferos y su papel fisiológico es la producción de calor como mecanismo de defensa frente al frío o para eliminar un exceso de calorías ingeridas. Su actividad transportadora está regulada por nucleótidos y ácidos grasos. Durante más de dos décadas, el grupo ha trabajado en el esclarecimiento de su mecanismo molecular de transporte y regulación.

La UCP2 se expresa en muchos tejidos siendo su papel principal la defensa frente al estrés oxidativo, disminuyendo la producción mitocondrial de especies reactivas. Además, la UCP2 juega un papel en el control del balance energético y, por ejemplo, modula la secreción de

insulina. Nuestro grupo investiga el papel de la UCP2 en tres modelos celulares: adipocitos blancos, células β -pancreáticas y células tumorales. Así, hemos demostrado que la metformina, un fármaco antidiabético, provoca estrés oxidativo en el tejido adiposo blanco y eleva los niveles de UCP2 antes de movilizar las reservas de triglicéridos. Además, trabajamos en el desarrollo de nuevos reguladores de las UCPs habiendo identificado derivados de cromano que inhiben la UCP1 y UCP2. Entre las posibles aplicaciones de estos inhibidores, se han patentado su uso como agentes antitumorales. Esta reivindicación deriva de la observación de que algunas líneas celulares tumorales elevan los niveles de UCP2 como mecanismo de defensa frente a agentes quimioterapéuticos cuya acción antitumoral se basa en la inducción de estrés oxidativo.

UCPs decrease the efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation by allowing the reentry into the matrix of the protons pumped during respiration. UCP1 is only expressed in the brown adipose tissue of mammals and its physiological role is the production of heat either as a mechanism of defense against the cold or to eliminate excess calories ingested. Its transport activity is regulated by nucleotides and fatty acids. For over two decades, one of the research interests of the group has been the elucidation of the molecular mechanism of transport of UCP1 and its regulation.

UCP2 is expressed in many tissues and its main role is the defense against oxidative stress by decreasing the mitochondrial production of reactive species. UCP2 also plays a role in the control of the energy balance and, for example, their activity modulates insulin secretion. Our group investigates the physiological role of UCP2 in three cellular models: white adipocytes, pancreatic β -cells and tumor cells. Thus, we have found that metformin, an antidiabetic drug, causes oxidative stress in white adipose tissue and raises UCP2 levels prior to the mobilization of the triglyceride reserves. We also work on the development of new UCP regulators. We have recently identified chromane derivatives that inhibit UCP1 and UCP2. Among the possible applications for these inhibitors, we have patented their use as antitumor agents. This claim stems from the observation that certain tumor cell lines raise UCP2 levels as a defense mechanism against chemotherapeutic agents whose antitumor action is based on the induction of oxidative stress.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Alonso-Monge, R., Carvahilo, S., Nombela, C., Rial, E., and Pla, J. (2009). The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Microbiology – SGM**, 155, 413-423.

González-Barroso, M.M., Giurgea, I., Bouillaud, F., Anedda, A., Bellanné-Chantelot, C., Huber, T.L., de Keyser, Y., de Lonlay, P., and Ricquier, D. (2008). Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion. **PLoS ONE** 3, e3850.

Anedda, A., Rial, E., and González-Barroso, M.M. (2008). Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. **J. Endocrinol.** 199, 33-40.

Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D., and Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. **Environ. Microbiol.** 10, 1690-1702.

Groves, P., Kövér, K.E., André, S., Bandorowicz-Pikula, J., Batta, G., Bruix, M., Buchet, R., Canales, A., Cañada, F.J., Gabius, H.J., Laurents, D.V., Naranjo, J.R., Palczewska, M., Pikula, S., Rial, E., Strzelecka-Kiliszek, A., and Jiménez-Barbero, J. (2007). Temperature dependence of ligand-protein complex formation as reflected by saturation transfer difference NMR experiments. **Magn. Reson. Chem.** 45, 745-748.

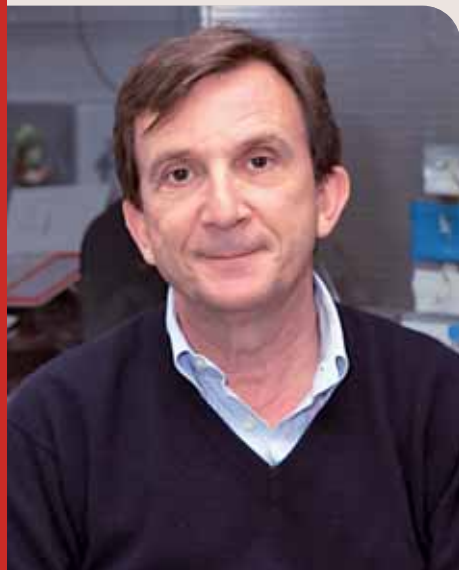
Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=39



Patentes | Patents

- Rial, E., Viso, A., Fernández de la Pradilla, F., and Castellanos, E.
Fecha de prioridad: 8 Octubre 2008
"Derivados de cromano y sus usos como inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes".
Número de solicitud Nacional: P200802811





Santiago Rodríguez de Córdoba
 Profesor de Investigación
 srdecordoba@cib.csic.es

Ph.D., 1981.
 Hospital Ramón y Cajal, Universidad Complutense de Madrid.
 Visiting Scientist, 1981.
 The New York Blood Center, NY, USA.
 Associate Investigator, 1986.
 The New York Blood Center, NY, USA.
 Científico Titular, 1986.
 Incorporación CIB, 1989.
 Investigador Científico, 1990.
 CIB, CSIC.
 Director Unidad de Patología Molecular, (1996-2002).
 Fundación Jiménez Díaz, Madrid
 Profesor de Investigación, 2000.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Arturo Jiménez Periañez
- Tamara Montes Fernández
- Silvana Mouron
- Sonia Alejo Martín
- Olga Criado García
- Belén García-Fojeda García-Valdecasas
- Elena Goicoechea de Jorge
- Rubén Martínez Barricarte
- Sheila Pinto García
- Ángela Ruiz Sánchez
- Agustín Tortajada Alonso

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
 Genetics and Experimental Models of Disease

Patología Molecular / Genética del Complemento

Molecular Pathology / Complement Genetics

Nuestro laboratorio utiliza técnicas genómicas y de biología molecular con el objetivo de descifrar las bases moleculares de enfermedades humanas. Nuestra actividad incluye identificar los genes que las causan y caracterizar funcionalmente sus variantes patogénicas mediante el análisis bioquímico, celular y estructural de las proteínas que codifican. Además, generamos modelos in vitro e in vivo de estas enfermedades con el objetivo de facilitar el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas.

We perform research in genomics and molecular genetics with a specific interest in the molecular bases of human disease. Our activities involve gene identification, mutation detection and biochemical, cellular and structural analysis of the proteins encoded by the disease-associated genes. A major objective is to generate in vitro and in vivo models to study the functional consequences of disease-associated mutations with the aim of developing preventive and therapeutic strategies.

Después de éxitos anteriores que nos permitieron identificar varios genes causantes de enfermedades, nuestro trabajo actual se centra en:

El sistema del complemento. El complemento es esencial en la inmunidad innata con papeles fundamentales en la infección, la eliminación de restos celulares y complejos inmunes. Sin embargo, es una espada de doble filo ya que su activación descontrolada se asocia con muchas enfermedades. La manera exacta por la que el complemento cambia de proteger a destruir no se entiende totalmente. Para comprenderlo estamos caracterizando las consecuencias funcionales de variaciones genéticas de los genes del complemento asociados al síndrome urémico hemolítico anormal, a la enfermedad por depósitos densos y a la degeneración macular asociada a la edad.

Enfermedad de Lafora (LD). LD es una enfermedad neurodegenerativa fatal y la causa más frecuente de epilepsia progresiva mioclónica en Europa meridional. Dos genes causan LD, EPM2A, que codifica una tirosina-fosfatasa dual denominada laforina y EPM2B, que codifica una E3-ubiquitina ligasa llamada malina. Después de "clonar" el gen EPM2A y demostrar que laforina interacciona con proteínas del metabolismo del glucógeno, hemos demostrado que el complejo laforina-malina (modulado por la proteína AMPK) regula la síntesis del glucógeno por un mecanismo nuevo que implica el ubiquitinilación y degradación proteosomal de glucógeno Sintasa y de PTG. Actualmente estamos estudiando funciones adicionales de laforina y de malina.

Transferencia de tecnología. Nuestra experiencia en secuenciación de DNA y sus aplicaciones nos ha permitido generar una compañía spin-off en el CIB (www.secugen.es) dedicada a secuenciación de DNA y diagnóstico molecular.

After previous success in mapping and identifying various disease-causing genes, our current work focuses on:

Disorders due to dysregulation of the complement system.

Complement is central to innate immunity with roles in bacterial killing, apoptotic cell clearance and immune complex handling. It is well-recognized that complement is a double-edged sword, with uncontrolled activation contributing to pathology in many diseases. However, the precise way in which complement shifts from protective to destructive roles is not completely understood. Using *in vitro* and *in vivo* models, we are currently studying the functional consequences of different genetic variations of the complement genes associated with atypical hemolytic uremic syndrome, dense deposit disease and age-related macular degeneration.

Lafora Disease (LD). LD is a fatal neurodegenerative disorder and the most frequent cause of progressive myoclonus epilepsy in Southern Europe. Two genes cause LD, EPM2A that encodes a dual protein tyrosine phosphatase known as laforin, and EPM2B encoding malin, an E3-ubiquitin ligase. We cloned EPM2A and demonstrated that laforin interacts with proteins implicated in glycogen metabolism. Recently, we showed that the complex formed by laforin and malin regulates glycogen metabolism by a novel mechanism involving the ubiquitinylation and proteosomal degradation of the GS and PTG proteins, and that formation of the laforin-malin complex is controlled by the AMPK protein. Additional roles for laforin and malin are currently being explored.

Technology transfer. Our expertise in DNA sequencing and its applications contributed to the generation of a spin-off company at the CIB (www.secugen.es) dedicated to DNA sequencing and molecular diagnostic.

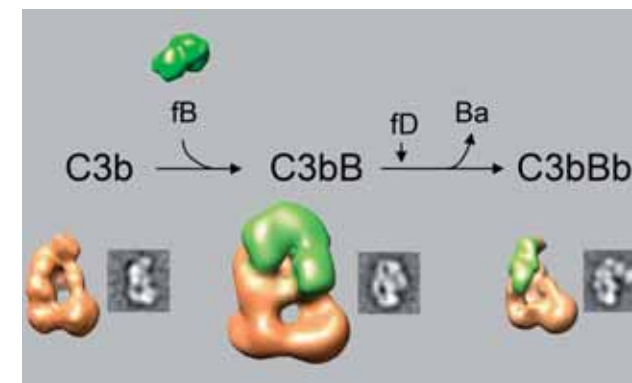


Fig. SRdeC1: Ensamblaje y activación de la C3-convertasa de la vía alternativa del Complemento. Para detalles ver Torreira et al. (2009). *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 882-887.

C3-convertase assembly and activation of the alternative complement pathway. See Torreira et al. (2009). *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 882-887, for details.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Torreira, E., Tortajada, A., Montes, T., Rodríguez de Córdoba, S*#, and Llorca, O*#. (2009). 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 882-887 (*Equal first and last author, # correspondence author).

Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcañiz, J.V., Fernández-Sánchez, M.E., García-Fojeda, B., Criado García, O., Sánchez-Piris, M., Aguado, C., Vilchez, D., Ros, S., Domínguez, J., García-Rocha, M., Guinovart, J.J., Knecht, E., Serratos, J., Sanz, P., and Rodríguez de Córdoba, S. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway *Hum. Mol. Genet.* 17, 667-678.

Goicoechea de Jorge, E., Harris, C.L., Esparza-Gordillo, J., Carreras, L., Aller Arranz, E., Abarrategui Garrido, C., López-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P., Morgan, B.P., and Rodríguez de Córdoba, S. (2007). Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 240-245.

Pickering, M.C.*#, Goicoechea de Jorge, E.*, Martínez-Barricarte, R., Recalde, S., García-Layana, A., Rose, K.L., Moss, J., Walport, M.J., Cook, H.T., Rodríguez de Córdoba, S.*#, Botto, M.* (2007). Spontaneous haemolytic uraemic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J. Exp. Med.* 204, 1249-56. (*Equal first and last author, # correspondence author. Published with Editorial commentary).

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño, M.I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba*, S., and Guinovart*, J.J. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nature Neurosciences* 10, 1407-1413 (2007). (*Equal last and correspondence author. Published with Editorial commentary).

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=21

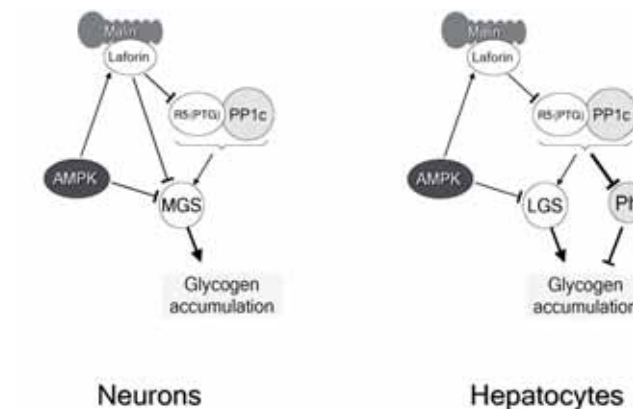


Fig. SRdeC2: Papel del complejo laforina-malina en la regulación de la síntesis de glucógeno. Para detalles ver Solaz et al. (2008). *Hum. Mol. Genet.* 17, 667-678.

Proposed role for the laforin-malin complex in the regulation of glycogen biosynthesis. See Solaz et al. (2008). *Hum. Mol. Genet.* 17, 667-678, for details.



Patentes | Patents

- Rodríguez de Córdoba, S. and Ramón y Cajal Agüeras, S.
 Fecha de prioridad: 2007. (19 Octubre 2007).
 "Procedimiento de diagnóstico y tratamiento del cáncer basado en la laforina, elementos biológicos para llevarlos a cabo y sus aplicaciones".
 Número de solicitud Nacional: P200702757.
 Número de solicitud Internacional: PCT/ES2008/070176.

- Joan Guinovart, J. and Rodríguez de Córdoba, S.
 Fecha de prioridad: 2007. (19 Octubre 2007).
 "Método de identificación de compuestos para terapia de enfermedades relacionadas con la acumulación de polímeros de glucosa y uso de compuestos para preparar medicamentos contra dichas enfermedades".
 Número de solicitud Nacional: P200702755.



Jose María Rojo Hernández
Investigador Científico
jmrojo@cib.csic.es

Ph.D., 1978.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral Fellow, (1980-1981).
Institute of Animal Physiology, A.R.C. Cambridge, UK.
Research Associate and Fulbright Fellow, (1986-1988).
Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA.
Científico Titular y Jefe de grupo, 1988.
CIB,CSIC.
Investigador Científico, 1990.
CIB,CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Raquel Bello Collantes
María Luisa del Pozo del Campillo
Julia Saez de Guinoa
Ilaria Seren Bernardone
María Paz Zafra

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

Activación de linfocitos T T cell activation

Los linfocitos T son una población esencial para el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas celulares y humorales efectivas frente a antígenos extraños. Nuestro grupo analiza diversos aspectos de la activación de estos linfocitos, incluyendo la estructura y función del complejo del receptor para antígeno de los linfocitos T (complejo TCR/CD3), y de otras moléculas de la superficie de los linfocitos T capaces de aumentar y modificar las señales del complejo TCR/CD3.

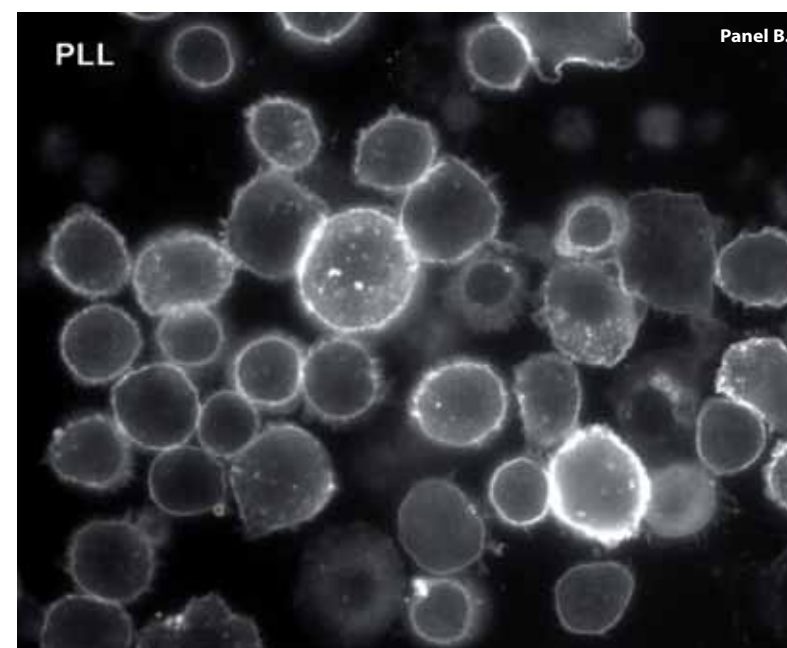
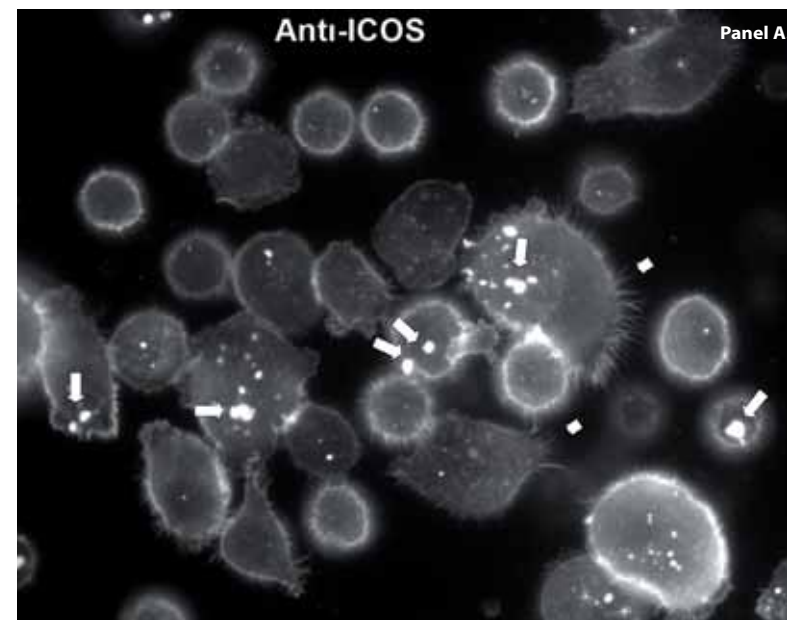
Our interest is focused on the activation of T lymphocytes, a population essential for the development of effective cell- and antibody-mediated adaptive immune responses to foreign antigens. We have analyzed the structure and function of the antigen receptor complex of T cells (TCR/CD3 complex), as well as the effects of surface molecules on T lymphocytes that enhance and/or modify the signals delivered by the TCR/CD3 complex.

A parte de los estudios acerca del papel en la activación antigénica de la variabilidad de la cadena CD3ε del complejo TCR/CD3 descrita por nuestro grupo, también se está analizando cómo moléculas reguladoras del sistema del complemento humano (CD46) o de ratón (Crry) pueden modificar la diferenciación de linfocitos T, y su impacto en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, o bien servir como receptores celulares para bacterias patógenas de gran importancia, como *Streptococcus pyogenes*.

Sin embargo, nuestro interés principal, en el marco del Proyecto FIS PI070484, es el estudio de ICOS (H4, Inducible Costimulator, CD278) en lo que respecta la hemostasis del sistema inmunitario y el control de enfermedades autoinmunes, incluyendo la encefalomielititis alérgica experimental. ICOS es una molécula coestimuladora de la activación de linfocitos semejante a CD28, pero expresada típicamente por linfocitos T activados. Estamos interesados especialmente en investigar el papel dual de ICOS y las células ICOS⁺ en los fenómenos inflamatorios debidos a reacciones inmunitarias, ya que se ha descrito que ICOS es importante tanto para la generación de células T que secretan citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y pro-inflamatorias (IL-17A), por lo que determinar las condiciones que favorecen uno u otro efecto puede ser de importancia terapéutica. Asimismo, nos interesa el papel de ICOS en la homeostasis de distintas subpoblaciones de linfocitos, incluyendo las células Treg FoxP3⁺, y otros linfocitos T reguladores. En segundo lugar, estamos determinando aquellas vías de activación celular susceptibles de ser modificadas por la coestimulación por ICOS, si las PI3-quinasas son las únicas moléculas implicadas en la coestimulación, y la posible relación de ICOS con las "balsas lipídicas" de la membrana celular.

In addition to studies on the role of CD3ε chain variability first described by our group in TCR/CD3 activation signals, we are carrying out several studies on the impact of human and mouse regulatory complement proteins (CD46, Crry) on T lymphocyte activation. We are also studying their possible role as cell receptors for human pathogenic bacteria, like *Streptococcus pyogenes*, or the importance of their co-signalling in the development of autoimmune diseases.

However, our main interest is in the analysis of ICOS (H4, Inducible Costimulator, CD278), a CD28-like costimulatory molecule, and its role in immune system homeostasis and the control of autoimmune diseases such as allergic experimental encephalitis (EAE). In particular, we are interested in the dual role of ICOS and ICOS⁺ cells in immune-mediated inflammation, as it has been described as an important costimulus in the generation of cells secreting anti-inflammatory (IL-10) and pro-inflammatory (IL-17A) cytokines, as well as fulfilling a role in the homeostasis of lymphocyte subpopulations, including FoxP3 Treg cells and other suppressor T lymphocytes. Moreover, we are determining the signalling pathways in T cells that are modified by ICOS and whether PI3-kinases are the only molecules involved in ICOS costimulation, as well as the possible localisation of ICOS within lipid rafts.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Oliver, M.A., Rojo, J.M., Rodríguez de Córdoba, S., Alberti, S. (2008). Binding of complement regulatory proteins to Group A *Streptococcus*. *Vaccine* 26S, 175-178. (doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.054)

Rojo, J.M., Pini, E., Ojeda, G., Bello, R., Dong, C., Flavell, R.A., Dianzani, U., and Portolés, P. (2008). CD4⁺ICOS⁺ T-lymphocytes inhibit T cell activation "in vitro" and attenuate autoimmune encephalitis "in vivo". *Int. Immunol.* 20, 577-589.

Castelli, L., Comi, C., Chiocchetti, A., Nicola, S., Mesturini, R., Giordano, M., D'Alfonso, S., Cerutti, E., Galimberti, D., Fenoglio, C., Tesser, F., Yagi, J., Rojo, J.M., Perla, F., Leone, M., Scarpini, E., Monaco, F., and Dianzani, U. (2007). ICOS gene haplotypes correlate with IL-10 secretion and Multiple Sclerosis evolution. *J. Neuroimmunol.* 186, 193-198.

Bello, R., Feito, M.J., Ojeda, G., Portolés, P., and Rojo, J.M. (2007). Loss of N-terminal charged residues of mouse CD3ε chains generates isoforms modulating T cell receptor-mediated signals and T cell receptor-CD3 interactions. *J. Biol. Chem.* 282, 22324-22334.

— Feito, M.J., Sánchez, A., Oliver, M.A., Pérez-Caballero, D., Rodríguez de Córdoba, S., Alberti, S., and Rojo, J.M. (2007). Membrane Cofactor Protein (MCP, CD46) binding to clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*: Binding to M type 18 strains is independent of Emm or Enn proteins. *Mol. Immunol.* 44, 3571-3579.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=25

Anticuerpos anti-ICOS adheridos a cubreobjetos (Anti-ICOS, panel A), pero no cubreobjetos con Poli-L lisina (PLL, panel B), inducen el desarrollo de filopodios (flechas cortas) y acúmulos de actina característicos, semejantes a adhesiones focales (flechas largas), en linfocitos T CD4⁺ ICOS⁺, de modo dependiente de la actividad PI-3 quinasa.

Glass surfaces coated with anti-ICOS monoclonal antibody (Anti-ICOS, panel A) but not surfaces covered with Poly-L-lysine (PLL, panel B) induce the development of filopodia by CD4⁺ ICOS⁺ T lymphocytes (short arrows), as well as focal-adhesion-like clumps of polymerized actin dependent on PI-3 kinase activity.





José Mª Sánchez-Puelles González-Carvajal
Investigador Científico
jmspuelles@cib.csic.es

Ph.D. en C.C. Biológicas, 1986.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, (1987-1988).
Instituto Max-Planck en Tuebingen, Alemania.
Senior Scientist, (1990-92).
Merck Sharp & Dome.
Director de Microbiología, (1992-99).
SmithKline Beecham.
Director R&D, (1999-2003).
Pharmamar.
Coordinador de Drug Discovery, (2004-08).
Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.
Investigador Científico, 2008.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Inmaculada Royo González.

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

El Factor Inducible de Hipoxia (HIF); mecanismos de actuación en los procesos de autorrenovación y diferenciación celular

Role of the Hypoxia Inducible Factor (HIF) in self-renewal and differentiation

El principal objetivo del proyecto del Grupo de Farmacología Molecular es estudiar el papel regulador del Factor Inducible por Hipoxia (HIF) en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y diferenciación de las células troncales adultas. HIF desempeña un papel esencial en los procesos de autorrenovación de células troncales y en la diferenciación celular, y está relacionado con los procesos que están regulando la aparición de subpoblaciones celulares denominadas células troncales tumorales o *cancer stem cells* (CSCs).

Hypoxia-inducible factors (HIF) play an essential role in tumour development and progression by regulating genes that are vital for proliferation, glycolysis, angiogenesis and metastasis. Although the mechanisms are not yet fully understood, the signalling pathways involved in controlling stemness expand the biology of HIF proteins from the normal maintenance of stem functions to the progression and aetiology of cancer stem cells. Our Group focuses on the role of HIF α proteins in the control of self-renewal and the differentiation of human adult stem cells.

Resultados previos de nuestro Grupo demostraron la implicación de HIF1 α y de la acetilación de histonas en la inestabilidad genética causada por la hipoxia en células troncales humanas. El proyecto de investigación del Grupo aborda el estudio de la inestabilidad genómica de las células troncales neurales de ratón y mesenquimales humanas en nichos hipóxicos y, si la exposición prolongada a la hipoxia subyace en la adquisición de fenotipo maligno en estas poblaciones celulares. Un segundo aspecto de nuestro interés es el estudio del papel de las proteínas α de HIF en la diferenciación celular de células troncales neurales y mesenquimales humanas. Uno de nuestros proyectos está enfocado en las interacciones de



HIF1 α con la ruta de señalización de Notch en células tumorales de colon metastásico y en subpoblaciones tumorales con propiedades de troncalidad (*cancer stem cells*, CSCs) de esta enfermedad oncológica. Por otro lado, nuestros resultados recientes demuestran que HIF2 α regula la diferenciación de células troncales neurales de rata, a través de la regulación directa de OCT3/4 y también de SOX-2, e indirecta de NANOG y TGF- α . En los próximos años abordaremos el estudio molecular de la intervención de la proteína 2 α en la diferenciación de células troncales neurales adultas y su intervención en los perfiles moleculares de subpoblaciones de CSCs procedentes de diferentes tipos de tumores sólidos. La utilización de fármacos específicos de las proteínas HIF α nos permite una aproximación farmacológica en los estudios de señalización celular en células troncales y tumorales.

Preliminary results obtained in our laboratory show that hypoxia causes genomic instability in stem cells, mostly by down regulating the mismatch repair system (MMR). HIF and the epigenetic mechanisms of histone acetylation control the transcriptional regulation of MMR genes, which ensure the fidelity of DNA replication. Our research focuses on stem cells that are exposed to prolonged hypoxia, deciphering their MMR status and genetic instability, together with the acquisition of tumour cell properties during self-renewal and cell differentiation. We are also interested in the interactions between HIF1 α and Notch in metastatic colon cancer cells and in subpopulations of tumours endowed with stem-like properties, the so-called cancer stem cells (CSCs). We have recently demonstrated that SOX-2 is a HIF2 α target gene, indicating that this subunit is one of the most relevant factors that govern pluripotency. In the following years, we will further characterize the molecular mechanisms by which HIF2 α controls cell fate and its putative role in the profiles of certain initiating tumour cells (CSCs). The availability of specific HIF α inhibitors allows a pharmacological approach to broaden the study of these proteins in the emerging field of regenerative medicine.

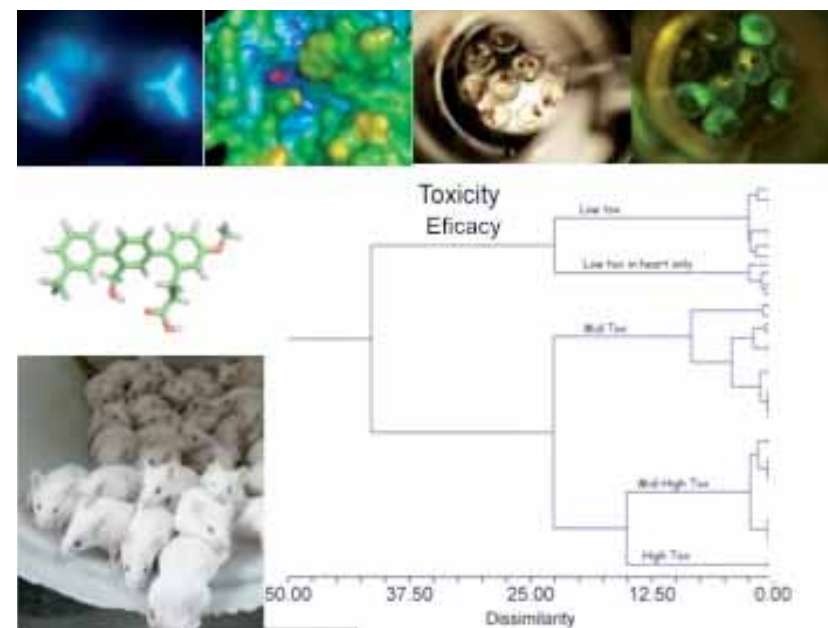


Fig. 2. Descubrimiento de nuevos Fármacos en instituciones académicas; desde la validación de dianas farmacológicas hasta el Desarrollo Preclínico temprano de nuevas entidades químicas.
Drug Discovery in Academia; from target validation to early Preclinical Development of New Chemical Entities.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

- Fernández-Jiménez, F.J., Moreno-Mazano, M.V., Lucas Domínguez, R., and Sánchez-Puelles, J.M. (2008). Hypoxia causes down-regulation of Mismatch Repair System and genomic instability in Stem Cells. *Stem Cells* 26, 2052- 2062.
- Lombó, F., Velasco, A., Castro, A., De La Calle, F., Braña, A.F., Sánchez-Puelles, J.M., Méndez, C., and Salas J.A. (2006). Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in streptomycetes. *ChemBiochem* 7, 366-376.
- Velasco, A., Acebo, P., Gómez, A., Schleissner, C., Rodríguez, P., Aparicio, T., Conde S., Muñoz, R., De La Calle, F., García, J.L., and Sánchez-Puelles, J.M. (2004). Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *P. fluorescens* A2-2: designing new antitumor compounds. *Mol. Microbiol.* 56, 144-154.

Ver más en: <http://www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=65>



Patentes | Patents

- Garijo, R., Aceña, J.L., Fustero, S., (8 inventores), and Sánchez-Puelles J.M. Fecha de prioridad: 11 de Marzo de 2008.
"Composición farmacéutica para inhibir el factor de transcripción inducible por hipoxia, moduladores de procesos patológicos de angiogénesis, oncogénesis, inflamación, apoptosis y terapia celular".
Número de solicitud Nacional: P200800/08.

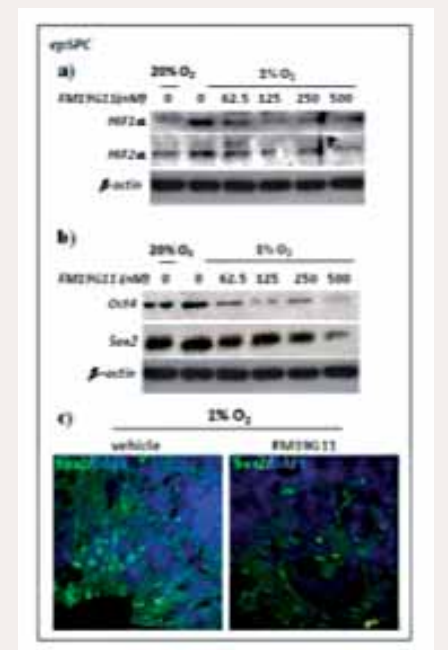


Fig. 1. Efecto de FM19G11 en células madre/progenitoras de rata de origen endodermial (epSPC). El tratamiento con FM19G11 inhibe de forma dosis-dependiente la expresión de las proteínas de HIF α (a) y de los marcadores de pluripotencialidad Sox2 y Oct4 (b) después de 48 h en hipoxia (1% O₂) en comparación con los niveles basales normoxia (20% O₂). Los resultados fueron normalizados con los niveles de expresión del gen constitutivo beta actina. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes. (c) Inmunoensayo representativo del efecto de FM19G11 en la expresión de Sox2 en un cultivo de neuroesferas indiferenciadas de epSPC en condiciones de hipoxia (1% O₂).
Effect of FM19G11 in rat endodermal stem cells (epSPC). FM19G11 inhibits in a dose-response manner the protein expression of HIF α proteins (a) and the pluripotency marks Sox2 and Oct4 (b) after 48 h in hypoxia (1% O₂) in compare to normoxic basal levels (20% O₂). Results were standardized by the housekeeping gene beta actin. Results were obtained from three independent experiments. (c) A representative immunostaining of Sox2 protein in undifferentiated neurospheres shows again a decreased protein expression on FM19G11 treated cells in compare to vehicle (DMSO) under hypoxia (1% O₂).



Augusto Silva González
Investigador Científico
asilva@cib.csic.es

Ph.D., 1981.
Clínica Puerta de Hierro, Universidad Complutense de Madrid.
Visiting Fellow, 1978. NIH., 1979. UCLA.
Postdoctoral ISREC 1981.
Group Leader, 1984. Clínica Puerta de Hierro.
Sabático, Institute Cancer Research, 1995.
Chester Beatty Laboratories, Londres.
Colaborador Científico, 1986. CIB, CSIC.
Investigador Científico, 2003 (En excedencia por servicios especiales). CIB, CSIC.
Subdirector Gral. ISCIII, 1992-94 y 2008.
Ministerio de Sanidad y Consumo.
Director Gral. Terapias Avanzadas y Trasplantes, 2008.
Ministerio de Sanidad y Política Social.



José A. García-Sanz
Científico Titular
jasanz@cib.csic.es

Ph.D., 1987. ISREC, Universidad de Barcelona.
Postdoctoral ISREC, 1987. Universidad de Miami, 1989.
Miembro Científico, 1991.
Basel Institute for Immunology.
Investigador contratado, 1997. CNB-CSIC.
Investigador Ramón y Cajal, 2003. CIB.
Científico Titular, 2008. CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Gema Elvira Serrano
- Alejandro Armesilla Díaz
- Paloma Bragado Domingo
- Walter Cantero Morales
- M^a Ángeles Lillo Osuna
- Eva Díaz Guerra
- Ignacio del Valle
- Rolando Vernal Astudillo

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
Genetics and Experimental Models of Disease

Genética del Cáncer y de las Células Madre del Cáncer
Cancer Genetics and Cancer Stem Cells

Las células madre adultas son responsables del mantenimiento de la homeostasis del tejido durante la vida del individuo. Se ha sugerido que estas células pueden acumular mutaciones, transformarse y generar células madre del cáncer. En este contexto, estamos interesados en investigar diversos aspectos de la biología de las células madre adultas y su posible relación con las células madre del cáncer, incluyendo la caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales generados en el laboratorio*.

* este trabajo forma parte de la Red de Terapia Celular del ISCIII.

Tissue-specific stem cells are responsible for maintaining tissue homeostasis throughout an individual's life. Furthermore, it has been suggested that these cells can accumulate mutations, transform and generate cancer stem cells. In this context, we are interested in understanding several aspects of adult stem cell biology and their possible relationship with cancer stem cells, including the analysis of a panel of monoclonal antibodies generated in the lab.*

* This work has been carried out in the context of the ISCIII network of Cell therapy (Red de Terapia celular).

Células Madre de glándula mamaria (E. Díaz-Guerra, M^a A. Lillo y J.A. García-Sanz). La glándula mamaria se desarrolla después del nacimiento bajo control hormonal. Con cada ciclo reproductivo sufre grandes cambios morfológicos y estructurales en los que están implicadas las células madre de glándula mamaria. El análisis del número y de la función de las células madre de glándula mamaria en diferentes estadios de su desarrollo muestra diferencias entre animales salvajes y transgénicos MMTV-neu, con una elevada tasa de tumores de mama, sugiriendo diferencias en las divisiones simétricas y asimétricas de las células madre. Además, el número estimado de células madre tiene una clara implicación en la determinación del tamaño del órgano.

Células madre: biología y patología (A. Armesilla, P. Bragado y A. Silva). Hemos determinado que p53 juega un papel crítico en la autorenovación tanto de células madre neurales como mesenquimales, afectando al patrón de diferenciación de estas células y a su control de estabilidad genómica. Actualmente, estamos analizando la capacidad de transformación espontánea de las células madre mesenquimales tanto in vivo como in vitro.

Caracterización de nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen células madre y progenitores tempranos neurales (I. del Valle, G. Elvira, V. Cantero, J.A. García-Sanz y A. Silva). Para aumentar nuestro conocimiento sobre la biología de las células madre adultas y de las células madre del cáncer, hemos generado nuevos anticuerpos monoclonales capaces de identificar células madre y progenitores tempranos neurales. Estamos trabajando en la identificación de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos, así como en su distribución en diferentes poblaciones de progenitores tempranos y células madre. Estos anticuerpos son capaces de identificar in vivo los nichos de dichas células, por lo tanto estamos tratando de determinar la dinámica de estas poblaciones en diferentes patologías neurales.

Mammary Stem Cells: (E. Díaz-Guerra, M^a A. Lillo and Jose A. García-Sanz). The mammary gland is a unique organ in that it undergoes most of its development after birth, under the control of systemic hormones. In addition, this organ is subject to major remodelling and architectonic changes in each reproductive cycle, orchestrated by mammary stem cells. Analysis of mammary stem cell number and function at different developmental stages, and in different genotypes, highlights the differences between mammary tumour-prone animals (MMTV-neu transgenics) and wild-type animals, suggesting differences in symmetric and asymmetric stem cell divisions. Furthermore, estimates of stem cell number have clear implications in determining organ size.

Stem cell biology and pathology (A. Armesilla, P. Bragado and A. Silva). We have found that p53 plays a critical role on both neural and mesenchymal stem cell self-renewal, affecting the differentiation of these cells and controlling genomic stability. We are currently analyzing the spontaneous transformation capacity of mesenchymal stem cells *in vivo* and *in vitro*.

Characterization of new antibodies recognizing neural stem cells and early progenitor cells. (I. Del Valle, G. Elvira, W. Cantero, J. A. García-Sanz and A. Silva). To improve our understanding of adult stem cell biology and gain insights into the behaviour of cancer stem cells, we have generated new monoclonal antibodies able to identify neural stem cells and early progenitor cells. We are working on the identification of the antigens recognized by these antibodies, as well as their distribution in several stem and early progenitor cell populations. The antibodies are also used to identify the stem and early progenitor cell niches *in vivo* and to determine the dynamics of these cell populations during pathological transitions.

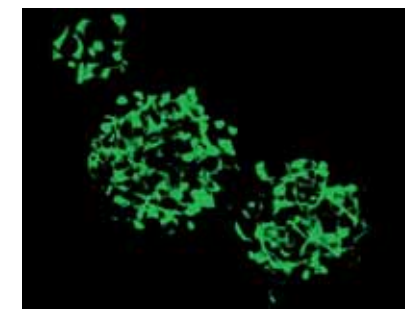


Fig. 1. Células madre neurales creciendo como neuroesferas que expresan el filamento intermedio nestina (marcador de células indiferenciadas).
Neural stem cells growing as neurospheres and expressing the intermediate filament nestin as a marker of the undifferentiated state.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Armesilla-Díaz, A., Bragado, P., Del Valle, I., Cuevas, E., Lázaro, I., Martín, C., Cigudosa, J.C., and Silva, A. (2008). p53 Regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. **Neuroscience**. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.052

Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., and Porras, A. (2007). Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. **Apoptosis** 12, 1733-1742.

Chuchana, P., Marchand, D., Nugoli, M., Rodríguez, C., Molinari, N., and García-Sanz, J.A. (2007). An adaptation of the LMS method to determine expression variations in profiling data. **Nucl. Acids Res.** 35, e71.

Díaz-Guerra, E., Vernal, R., del Prete, M.J., Silva, A., and García-Sanz, J.A. (2007). CCL2 Inhibits the Apoptosis Program Induced by Growth Factor Deprivation, Rescuing Functional T Cells. **J. Immunol.** 179, 7352-7357.

del Prete, M.J., Vernal, R., Dolznig, H., Mullner, E.W., and García-Sanz, J.A. (2007). Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. **RNA** (New York, NY) 13, 414-421.

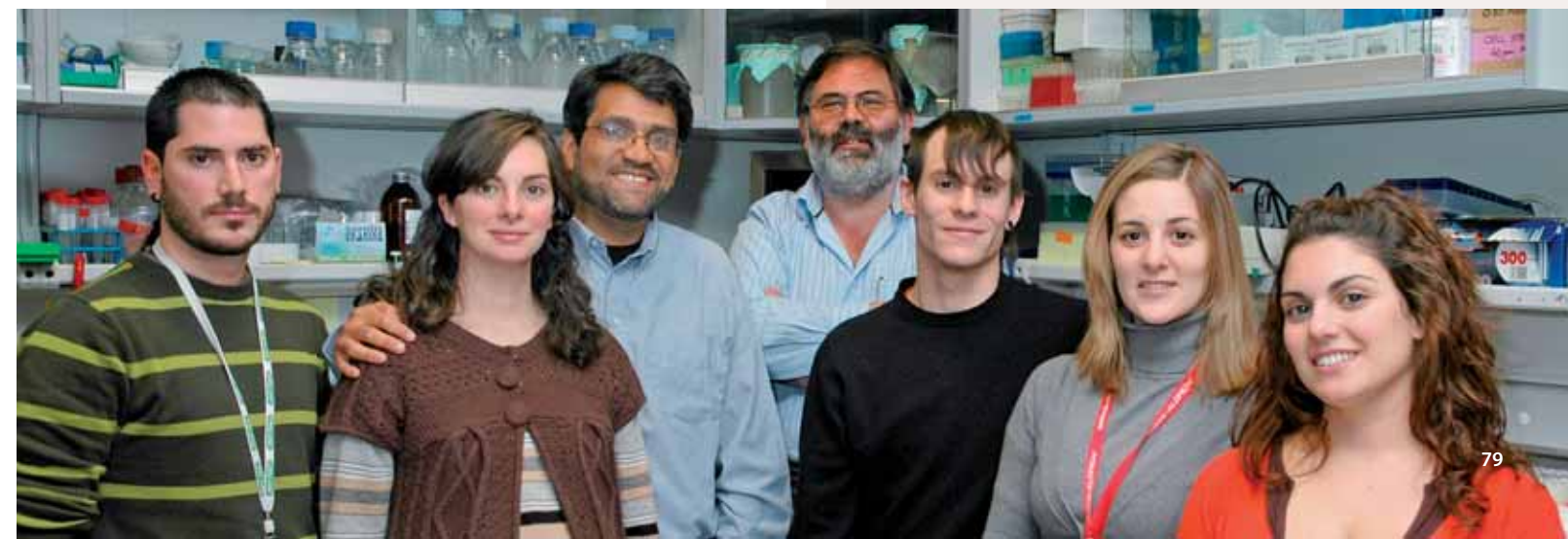
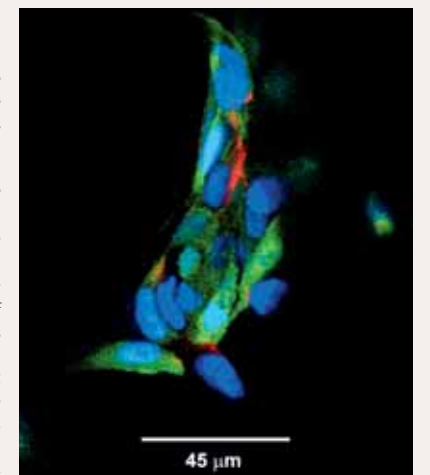
Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=26



Patentes | Patents

- Augusto Silva González, Ignacio del Valle y Leyre García Benzaquén.
Fecha de prioridad: 2008 (8 de Mayo de 2008)
"Anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO2".
Número de solicitud Nacional: P200702757.

Fig. 2. Microscopía de fluorescencia de células de astrocitoma de ratón (verde), reconocidas por un anticuerpo monoclonal específico de células madre neurales conjugado con nanopartículas magnéticas (rojo). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).
Fluorescence microscopy of mouse astrocytoma cells (green) stained with a monoclonal antibody specific for neural stem cells coupled to magnetic nanoparticles (red). Nuclei were stained with DAPI (blue).





Joaquín Teixidó Calvo
 Profesor de Investigación
 joaquin@cib.csic.es

PhD., 1985.
 Max Plank Institute für Molekulare Genetik, Berlin, and Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.
 Postdoctoral.
 University of Massachusetts; Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA.
 Científico Titular, 1992.
 Incorporación y Jefe Grupo, 1994.
 Investigador Científico, 2003.
 Profesor de Investigación, 2007.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Rubén A. Bartolomé Conde
- Georgina P. Colo
- David García Bernal
- Pablo Hernández Varas
- Isabel Molina Ortiz
- Ana Serrano Somavilla
- Noemí Arellano Sanchez

Genética y Modelos Experimentales de Enfermedad
 Genetics and Experimental Models of Disease

Chemokines and Cell Migration Quimioquinas y Migración Celular

Nuestra investigación se centra en la caracterización de la señalización intracelular requerida para la adhesión y migración celular en respuesta a quimioquinas. Procesos fisiológicos que comportan migración y activación celular, tales como respuesta inmune y recirculación linfocitaria, así como patologías tales como inflamación y cáncer, están controladas por quimioquinas. Tras su unión a sus receptores acoplados a proteínas G, las quimioquinas activan moléculas señalizadoras para migración celular, expresión génica y proliferación, como diferentes GTPasas y fosfatidilinositol 3-quinasa.

Our main research concerns the characterization of intracellular signalling required for cell adhesion and migration in response to chemokines. Physiologic processes involving cell migration and activation including immune response and lymphocyte surveillance, as well as pathologic conditions such as inflammation and cancer, are governed by chemokines. Upon binding to their G protein-coupled receptors, chemokines activate signalling pathways for cell migration, gene expression and proliferation, including GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases.

La caracterización de la señalización inducida por quimioquinas es clave para relacionar activación y respuestas celulares, tanto en condiciones fisiológicas como en procesos patológicos. Nuestros modelos celulares incluyen la migración y activación de linfocitos T y células tumorales. En el primer modelo estudiamos moléculas activadas por quimioquinas requeridas para la estimulación de la adhesión de células T mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$, un paso clave en el tráfico linfocitario hacia lugares de inflamación durante la respuesta inmune. Nuestro modelo propone que una plataforma de señalización compuesta por talin y Vav1 es esencial para cambios dinámicos en las asociaciones entre estas moléculas tras la activación por quimioquinas. Los resultados se han obtenido utilizando linfocitos T humanos, y el siguiente paso utilizaremos modelos inflamatorios en ratón y diferentes ratones *knock-out* para investigar de un modo más fisiológico el papel de esta plataforma de señalización durante la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

En el segundo modelo, estamos estudiando el papel de las quimioquinas en la metástasis de células de melanoma. El melanoma es un cáncer agresivo cuando se vuelve metastásico, y las terapias actuales son insuficientes para inhibir la diseminación del tumor. De este modo, la caracterización de los mecanismos que controlan la metástasis de melanoma es importante para un futuro desarrollo de mejores terapias. CXCR4 es el receptor de quimioquinas más frecuentemente expresado en células tumorales, y contribuye a su diseminación hacia órganos y tejidos en los que se expresa su ligando. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* ha

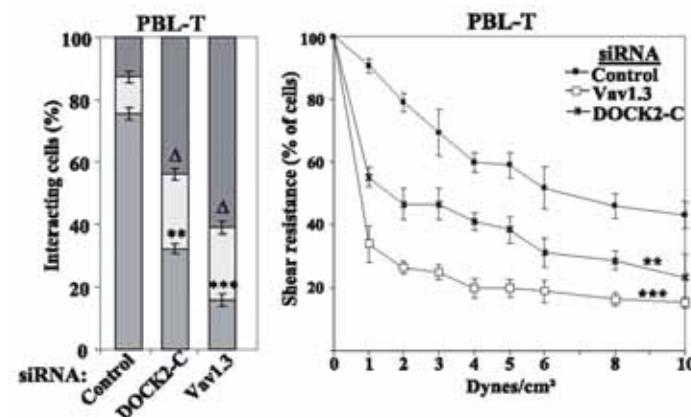


Fig. 1. Vav1 juega un papel clave en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T humanos dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en condiciones de flujo. (Para detalles ver García-Bernal, J. Immunol. 177, 5215-5225, 2006).
 Vav1 plays a crucial role for chemokine-stimulated human T lymphocyte adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$ under flow conditions. (See García-Bernal et al., J. Immunol. 177, 5215-5225, 2006, for details).

demostrado que la activación de la vía Vav-RhoGTPasa regula la invasión de células de melanoma, en la que estaría implicada la estimulación de la metaloproteínasa MT1-MMP. Nuestros estudios futuros se dirigirán a una mejor caracterización de esta vía utilizando modelos xenograft y genéticos.

Characterization of chemokine-induced signalling is fundamental to relate cell activation will cell responses, both in physiologic and pathologic processes. Our cellular models are T lymphocyte and tumor cell migration and activation. In the first model we study the molecules activated by chemokines that lead to $\alpha 4\beta 1$ integrin activation and upregulation of T cell adhesion, a key step in lymphocyte trafficking to inflammatory sites during the immune response. Our work proposes that a signalling platform formed by talin and Vav1 is essential for dynamic changes in associations in response to chemokines. This has been achieved using human T lymphocytes, and our next step is to use mouse models of inflammation and already available *knock-out* mice to further investigate in a more physiologic set-up the role of this signalling platform during T lymphocyte-mediated immune response.

In the second model, we are studying the role of chemokines in the metastasis of melanoma cells. Melanoma is an aggressive cancer when metastasis starts, and current therapies are insufficient to inhibit tumor dissemination. Therefore, characterization of mechanisms controlling melanoma metastasis is important for future development of improved therapies. CXCR4 is the most common chemokine receptor expressed by cancer cells, and contributes to their dissemination to organs and tissues where its ligand is expressed. Our *in vitro* and *in vivo* work has demonstrated that activation of Vav-RhoGTPase signalling regulates melanoma cell invasion, involving stimulation of the metaloproteínasa MT1-MMP. Our future studies will address further characterization of this pathway using xenograft and genetic *in vivo* cancer models.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Bartolomé, R.A., Ferreiro, S., Miquilena-Colina, M.E., Martínez-Prats, L., Soto-Montenegro, M.J., García-Bernal, D., Vaquero, J.J., Agami, R., Delgado, R., Desco, M., Sánchez-Mateos, P., and Teixidó, J. (2009). The chemokine receptor CXCR4 and the metalloproteinase MT1-MMP cooperate during melanoma metastasis. *Amer. J. Pathol.* En prensa. doi: 10.2353/ajpath.2009.080636

Bartolomé, R.A., Wright, N., Molina-Ortiz, I., Sánchez-Luque, F.J., and Teixidó, J. (2008). Activated $G\alpha_{13}$ impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res.* 68, 8221-8230.

Parmo-Cabañas, M., García-Bernal, D., García-Verdugo, R., Kremer, L., Márquez, G., and Teixidó, J. (2007). Intracellular signaling required for CCL25-stimulated T cell adhesion mediated by the integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Leukoc Biol.* 82, 380-391.

Bartolomé, R.A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sánchez-Mateos, P., Bustelo, X., and Teixidó, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signalling by CXCL12 controls MT1-MMP -dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 66, 248-258.

García-Bernal, D., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Samaniego, S., Fukui, Y., Stein, J., and Teixidó, J. (2006). DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Immunol.* 177, 5215-5225.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=27

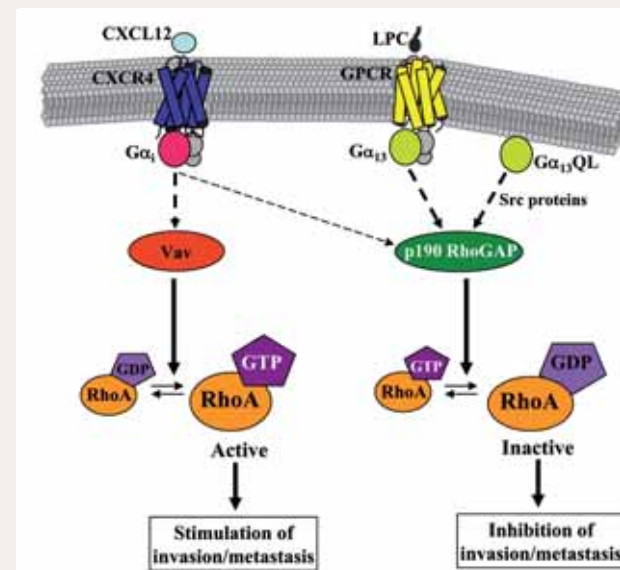


Fig. 2. Modelo de la regulación dependiente de Rho de la invasión de células de melanoma en respuesta a estimulación de receptores acoplados a proteínas G. (Para detalles ver Bartolomé et al. Cancer Res. 68, 8221-8230, 2008).

Model for Rho-dependent regulation of melanoma cell invasion in response to G-protein coupled receptor stimulation. (See Bartolomé et al. Cancer Res. 68, 8221-8230, 2008, for details).



Ángela Casado Moragón

Científica Titular
acasado@cib.csic.es

Licenciada en Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.

Ph.D., 1972.
Universidad Complutense de Madrid.

Científica Titular, 1972.
CSIC.

Jefa de Grupo desde 1986.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Carlos Campos Vaquero
Gustavo González Calvo
Rodrigo Guzmán Martínez
M^a Encarnación López Fernández.

Mecanismos de Desarrollo, Degeneración y Envejecimiento
Mechanisms in Development, Degeneration and Aging

Biomarcadores de Estrés Oxidativo y Procesos de Envejecimiento Oxidative Stress Biomarkers and Aging Processes

Nuestro grupo determina, utilizando diversos marcadores de estrés oxidativo, el daño oxidativo al DNA, proteínas y lípidos producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y su implicación en el proceso de envejecimiento y patologías relacionadas (Alzheimer, Down). También analizamos en que medida la ingesta de antioxidantes (dieta o suplementos) puede paliar el efecto nocivo de ROS, y el papel del SH₂ en los efectos antioxidantes de aguas mineromedicinales sulfuradas y sulfatadas.

We perform research on aging processes, paying special attention to the end products of mitochondrial and nuclear DNA oxidation, lipid peroxidation, protein oxidation and free radicals, as well as the effects of ROS on human lymphocytes in Down's syndrome and Alzheimer's patients. We also determine whether antioxidant intake may reduce the risk of different age-related diseases, as well as the role of hydrogen sulphide in antioxidants and the effects of crenotherapeutic treatment with sulphured and sulphated mineral waters.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas durante el metabolismo celular están implicadas en el proceso de envejecimiento ya que provocan una cadena de lesiones oxidativas en el interior celular, afectando a proteínas, DNA y lípidos. Se ha postulado que existe un equilibrio dinámico entre generación de ROS y actividad de sistemas de defensa antioxidante. Los antioxidantes protegen las estructuras celulares de la acción nociva de ROS, de ahí su implicación en el proceso de envejecimiento.

Síndrome de Down (SD). SD, una alteración genética asociada a la presencia de tres copias del cromosoma 21, presenta envejecimiento prematuro debido a la presencia de estrés oxidativo elevado, causado por sobreexpresión (como demostramos hace años) del gen Cu/ZnSOD codificado en cromosoma 21, región 21q22.1. Como marcadores de estrés oxidativo se analizan: 8OHdG (daño oxidativo a DNA); MDA, 8-isoprostanos (lípidos); nitritos, nitros, NO y grupos carbonilo (proteínas), y poder antioxidante total.

Demencia Alzheimer (DA). El estrés oxidativo en DA es debido a que el sistema nervioso central es particularmente vulnerable al efecto de ROS por su elevado consumo de oxígeno, su abundante contenido de ácidos grasos poliinsaturados y la relativa precariedad de algunos enzimas antioxidantes, unido a la presencia (en cerebros de pacientes con DA) de hierro, mercurio y aluminio, que son potentes catalizadores para la producción de ROS. Hemos valorado marcadores de estrés oxidativo en sangre y respuesta a diferentes tratamientos antioxidantes.

Efectos protectores de aguas mineromedicinales sulfuradas. Analizamos los efectos antioxidantes de aguas mineromedicinales con niveles elevados de SH₂ en diversas patologías relacionadas con el envejecimiento.

Reactive oxygen species (ROS) generated during cellular metabolism are involved in aging processes. ROS are unstable compounds that exert toxic effects by reacting with lipids, proteins and nucleotides to produce oxidised compounds. It has been postulated that a dynamic equilibrium exists between the generation of ROS and the level of antioxidant defences. Thus, antioxidants protect biological system from oxidants and have been considered to delay aging.

Down's syndrome (DS). DS is a genetic abnormality caused by the presence of three copies of chromosome 21 in which premature aging is associated with elevated oxidative stress caused by the overexpression of Cu/ZnSOD gene situated at chromosome 21q22.1. In studying this condition, we have analysed different markers of oxidative stress including: 8OHdG (DNA damage); MDA and 8-isoprostane (lipids); nitrites, nitrates, NO and carbonyls (protein); as well as the total antioxidant capacity.

Alzheimer Dementia (AD). The influence of oxidative stress in AD is focused on the following premise: although the brain has a high oxygen consumption and it is rich in easily peroxidizable unsaturated fatty acids, it is relatively deficient in many antioxidants like catalase, and it accumulates a high content of metals such as Fe, Hg or Al that strongly catalyse ROS production. Thus, we have evaluated oxidative stress markers in the blood and the response to antioxidant treatments.

Antioxidant effects of sulphurous waters. We are analysing the protective effects of the administration of sulphurous mineral-medical waters against ROS damage in age-related diseases. Sulphurous waters may be valuable in preserving and enhancing antioxidant status.



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Casado, A., Castellanos, A., López-Fernández, M.E., Ruiz, R., García Aroca, C., and Noriega, F. (2008). Relationship between oxidative and occupational stress and aging in nurses of an intensive care unit. **AGE**. 30:229-239.

Casado, A., López-Fernández, M.E., Casado, M.C., and de la Torre, R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Vascular and Alzheimer dementias. **Neurochem. Res.** 33(3), 450-458.

Casado, A. (2007). Oxidation and protection of calcium channels in senile dementia. In: Medical and Biological Papers, Edited by Fundación Eugenio Rodríguez Pascual. Pag. 153-169.

Casado, A., de la Torre, R., and López-Fernández, M.E. (2007). Copper/zinc superoxide dismutase activity: from newborns to young Spanish people. **Indian J. Med. Res.** 125(5), 655-660.

Casado, A., López-Fernández, M.E., and Ruiz, R. (2007). Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21. **Clin. Chem. Lab. Med.** 45(1), 59-62.

Ver más en: www.cib.csic.es/grupo.php?idgrupo=55





Flora de Pablo
Profesora de Investigación
fdepablo@cib.csic.es

M.D., 1975, Ph.D., 1979.
Especialista en Endocrinología y Nutrición, 1979.
Facultad de Medicina, Univ. Salamanca.
Postdoctoral Visiting Fellow (1980-1982).
Visiting Scientist (1984-1991).
NIH, Bethesda, USA.
Adjunta, Serv. de Endocrinología (1982-1984).
Hospital de la Sta. Cruz y San Pablo, Barcelona.
Investigadora Científica (1990, incorporada 1991).
CIB, CSIC.
Associate Investigator (1995-1996).
Caltech, Pasadena, USA.
Profesora de Investigación, 2003.
CIB, CSIC.



Enrique J. de la Rosa
Investigador Científico
ejdelarosa@cib.csic.es

Ph.D. en Ciencias Biológicas, 1984.
Universidad Autónoma de Madrid.
Postdoctoral (1986-1989).
Instituto Max-Planck de Biología del Desarrollo, Tübingen,
Alemania.
Postdoctoral (1989-1992).
Instituto Cajal, CSIC, Madrid.
Científico Titular, 1993.
Investigador Científico, 2002.
CIB, CSIC.

Investigadoras del equipo | Staff Scientists:

Patricia Boya
Catalina Hernández Sánchez
Teresa Suárez

Mecanismos de Desarrollo, Degeneración y Envejecimiento
Mechanisms in Development, Degeneration and Aging

Laboratorio 3D: Desarrollo, Diferenciación, Degeneración
3D Lab: Development, Differentiation, Degeneration

El desarrollo de un organismo multicelular requiere proliferación y diferenciación celulares adecuadas en el tiempo, y un balance correcto entre supervivencia y muerte celular. Las formas de muerte celular programada incluyen la apoptosis, la necrosis y la autofagia, peor conocida. En *Dictyostelium discoideum*, organismo unicelular, la muerte celular juega un papel esencial en diferenciación. Dos moléculas de señalización con funciones no-canónicas en desarrollo, la proinsulina y la dopamina, pueden ser importantes en la cardiogénesis.

Development of a multicellular organism requires timely cell proliferation and differentiation, and a correct balance between cell survival and death. There are different forms of cell death, including apoptosis, necrosis and autophagy, the latter of which is much more poorly understood. In the unicellular *Dictyostelium discoideum*, cell death plays an essential role in differentiation. In this regard, two signalling molecules with non-canonical functions during development, proinsulin and dopamine, may be important in cardiogenesis.

Nuestro grupo aborda desde preguntas biológicas básicas a enfoques biomédicos traslacionales, con objeto de entender los mecanismos y la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Específicamente, estudiamos estos aspectos en el desarrollo embrionario y en modelos de degeneración celular, incluyendo una posible perspectiva terapéutica de la proinsulina (precursora de la insulina). Utilizamos diversos modelos, vertebrados (pollo, ratón), invertebrado (*Dictyostelium*) y líneas celulares (murinas y humanas). Los estudios actuales incluyen: a) Modulación de la autofagia, proceso implicado en el reciclado de proteínas y muerte, mediante drogas y por aproximaciones genéticas, en la retina en desarrollo y en modelos de Glaucoma y Parkinson. b) Análisis de mutantes que afectan a la reparación del daño al DNA e implican cambios de competencia entre células durante el desarrollo. c) Caracterización de la degeneración de los fotorreceptores en modelos de Retinosis Pigmentaria, ratón Rd10 y otros. d) Desarrollo de una forma de aplicación de Proinsulina, o derivados, incluyendo vectores AAV, que pueda llegar a ser utilizada en humanos como terapia neuroprotectora en la Retinosis Pigmentaria. El grupo ha creado en 2007 una empresa *spin-off* (ProRetina Therapeutics S.L., ver pg. 166) a la que ha licenciado la primera patente registrada en este campo. e) Caracterizar la expresión de la Tirosina Hidroxilasa, enzima que cataliza el paso de la L-Dopa a la catecolamina Dopamina, y analizar la función de esta molécula en el desarrollo cardiaco y el desarrollo de páncreas.



The aim of our research is to answer basic biological questions regarding the mechanisms and regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death in embryonic development, as well as in models of cell degeneration. We pay special attention to the possibility of advancing the translational issues related to these events, such as the possible therapeutical applications for proinsulin (the precursor of insulin). These studies are carried out in different vertebrate models (mouse and chick embryos), an invertebrate model (*Dictyostelium*), and in murine and human cell lines. Our current studies focus on different issues, such as the modulation of autophagy, a process implicated in the recycling of proteins and cell death, which we study during development, as well as in models of Glaucoma and Parkinson, by employing pharmacological and genetic manipulations. We are also analysing mutants affecting DNA repair that appear to imply changes in cell competence during development. We continue to characterize photoreceptor degeneration in models of Retinitis Pigmentosa, in the Rd10 mouse and other models. Indeed, we are developing a means to apply Proinsulin or its derivatives, including AAV vectors, to be used as a neuroprotective agent in Retinitis Pigmentosa in humans. These studies have led to the founding of a *spin-off* company (ProRetina Therapeutics S.L., see page 166) to license the first patent registered. Finally, we have characterized the expression of Tyrosine Hydroxylase, the enzyme that catalyzes the conversion of L-Dopa into the catecholamine Dopamine, and we are analyzing the function of the latter in cardiac and pancreatic development.

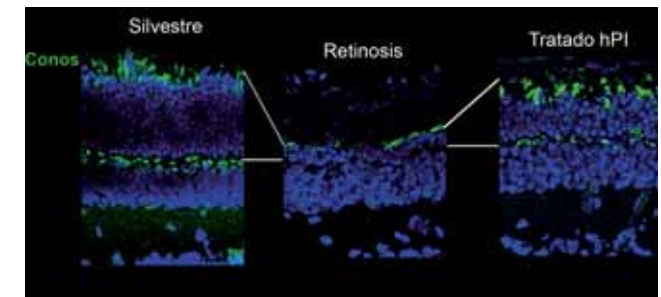


Fig. 1. Degeneración de fotorreceptores en retina de ratón postnatal, en el modelo de Retinosis Pigmentaria rd10, respecto al silvestre, y tras Proinsulina. Photoreceptor degeneration in the postnatal retina from a rd10 mouse, a model of Retinitis Pigmentosa, compared with the wild type and after Proinsulin. See Corrochano et al. 2008 for details.

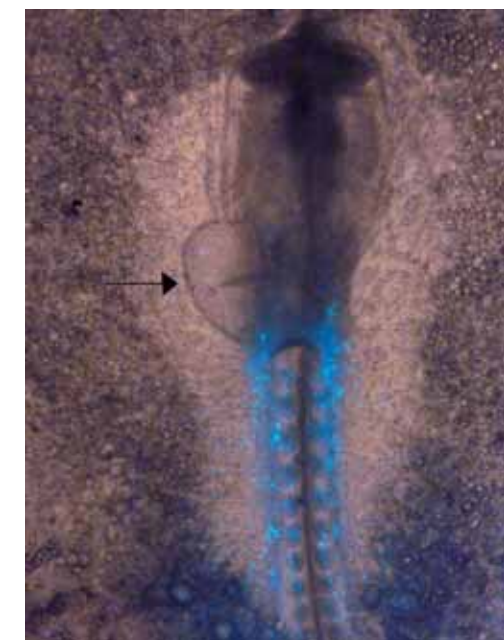


Fig. 2. Expresión de la GFP en embrión de pollo de 36 horas electroporado con vector bicistrónico conteniendo el cDNA de Tirosina Hidroxilasa. GFP expression in a 36 hr chick embryo electroporated with a bicistronic vector containing the cDNA of TH. Bártulos, López, García, De Pablo and Hernández-Sánchez (unpublished).



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Corrochano S, Barhoum R, Boya P, Arroba AI, Rodríguez-Muela N, Gómez-Vicente V, Bosch F, De Pablo F, de la Villa P, and de la Rosa E.J. (2008). Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 49, 4188-4194.

Mellén, M.A., de la Rosa, E.J., and Boya, P. (2008). The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. **Cell Death Differ.** 15, 1279-1290.

Núñez-Corcuera, B., Serafimidis, I., Arias-Palomo, E., Rivera-Calzada, A., and Suarez, T. (2008). A new protein carrying an NmrA-like domain is required for cell differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** 321, 331-342.

Chavarría, T., Valenciano, A.I., Mayordomo, R., Egea, J., Comella, J.X., Hallböök, F., De Pablo, F., and de la Rosa, E.J. (2007). Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. **Dev. Neurobiol.** 67, 1777-1788.

Hernández-Sánchez, C., Bártulos, O., Valenciano, A.I., Mansilla, A., and De Pablo, F. (2006). The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development. **Nucleic Acid Res.** 34, 3455-3464.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=20



Patentes | Patents

- de la Rosa Cano, E.J., De Pablo Dávila, F., Boya Tremoleda, F.P., Corrochano Sánchez, S., de la Villa Polo, P., Barhoum Tannous, R., and Bosch Tubert, F.
Fecha de prioridad: 2006.

"Uso de la proinsulina para la elaboración de una composición farmacéutica neuroprotectora, composición terapéutica que la contiene y sus aplicaciones".
Número de solicitud Nacional: 200601314.
Solicitud Internacional: PCT/ES2007/070097.
Licenciada por ProRetina Therapeutics S.L., Octubre 2007.

- Esteve, J., Plaza, J.A., Gómez, R., de la Rosa, E.J., Suárez, T., Vázquez, P., Boya, P., Nogués, C., Barrios, L., Ibáñez, M.E., Llobera, M., Rosas, E., Sánchez, F.J., Marco, M.P., González, D., and Muriano, A.
Fecha de prioridad: 2007.

"Dispositivo intracelular útil como actuador o elemento sensor de actividad biológica".
Número de solicitud Nacional: P20072623.
Solicitud Internacional: PCT/ES2008/070185.

- Hernández-Sánchez, C., De Pablo Dávila, F., Bártulos Encinas, O., and Aránega, A.
Fecha de prioridad: 2008.
"Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos".
Número de solicitud Nacional: P200802422

Otros Miembros | Other lab Members:

Ana I. Arroba
Marta Fierro
Violeta Gómez Vicente
Carolina Isiegas
Patricia Vázquez
Teresa Chavarría
Jimena Baleriola
Óscar Bártulos
Ane Garcíandía
Enrique Martínez Campos
M^a Ángeles Mellén
Natalia Rodríguez Muela
Reda M. Mohamed Salem
Ana María Robles
Sergio H. Latorre
María Lirón
Cayetana Murillo



Ángeles Martín Requero
Investigadora Científica
amrequero@cib.csic.es

Ph.D., 1978.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral.
University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.
Científica Titular, 1985.
Investigadora Científica, 2008.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Ofelia García Hermida

Otros Miembros | Other lab Members:

Carolina Alquezar Burillo
Fernando Bartolomé Robledo
Noemí Esteras Gallego
Úrsula Muñoz Morón

Mecanismos de Desarrollo, Degeneración y Envejecimiento
Mechanisms in Development, Degeneration and Aging

Bases Celulares y Moleculares de la Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias

Cellular and Molecular Basis of Alzheimer's disease and other Dementias

Nuestro grupo pretende desvelar la posible contribución de fallos en el control del ciclo celular a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, así como en otros trastornos neurodegenerativos como la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Este campo de investigación se inició hace solamente unos pocos años y empieza a admitirse que una entrada aberrante en ciclo celular, por parte de ciertas neuronas, es una de las causas más importantes de la pérdida neuronal por apoptosis. La originalidad de nuestra propuesta radica en la utilización de células extraneurales de pacientes para estudiar los procesos de proliferación y apoptosis asociados a la neurodegeneración.

Our group is engaged in research aimed at evaluating the potential contribution of disruptions in cell cycle control to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other dementias, as well as in other neurodegenerative disorders such as Amyotrophic Lateral Sclerosis. The innovative aspect of this work is that we consider non-neuronal cells from patients as a suitable model to study events such as cell proliferation and apoptosis that are associated with neurodegenerative pathogenesis.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en los adultos. En Europa constituye una de las primera causas de muerte, sin que hasta el momento se disponga de terapias efectivas para paliar o retrasar su aparición.

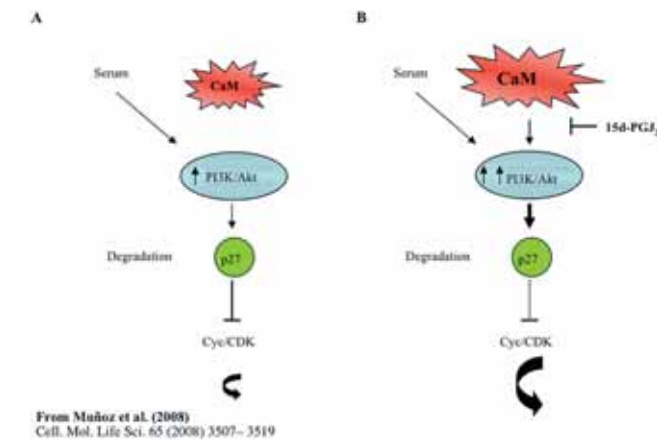
Una de las características de esta enfermedad es la degeneración neuronal irreversible en regiones del cerebro asociadas con las funciones cognitivas. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la entrada aberrante de ciertas neuronas en el ciclo celular está asociada a la muerte neuronal. En nuestro laboratorio estamos estudiando algunos de los mecanismos de control del ciclo celular y/o supervivencia, que pueden contribuir a la patología de EA, utilizando como modelo experimental linfocitos inmortalizados de pacientes de EA. Nos basamos en observaciones previas, de nuestro y de otros laboratorios, que indican que la EA tiene también manifestaciones sistémicas, cuya repercusión funcional podría pasar desapercibida.

En la actualidad, estamos intentando elucidar el papel de la vía Ca^{2+} /calmodulina y su interacción con las rutas de señalización mediadas por PI3K/Akt, MAP quinasas, PPARy y Wnt/ β -catenina en el control de supervivencia/muerte celular. Pretendemos ampliar este estudio a otras demencias y enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Asimismo estamos interesado en comprobar si las alteraciones encontradas en células periféricas reflejan cambios similares en cerebro utilizando un modelo murino de amiloidosis (Tg APP/PS1). La importancia de validar este modelo experimental, que utiliza células extraneurales, fácilmente accesibles, radica no sólo en avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia de la EA, sino también en la posibilidad de desarrollar sistemas simples de diagnóstico precoz de esta devastadora enfermedad.

The most common cause of dementia in mid-to late-life is Alzheimer's disease (AD). In Europe, AD is a leading cause of death and there are to date no disease modifying drugs currently available. Thus, elucidating the pathogenic mechanisms leading to AD and designing an effective treatment, preventive or curative, is imperative.

One of the characteristics of AD is the progressive neuronal loss in certain brain regions associated with cognitive functions. In the last few years, it has been hypothesised that certain neurons attempting to re-enter the cell cycle might cause neuronal death. The main goal of our research is to study some of the mechanisms that control cell cycle progression and cell survival using immortalized lymphocytes from control and AD patients as our experimental model. Based on previous observations, we hypothesized that AD is a systemic disorder with more prominent neurological manifestations.

At present we are engaged in elucidating the interaction between Ca^{2+} /CaM with the survival/death pathways, specifically the PI3K/Akt, MAPK or Wnt pathways. We plan to extend this study to encompass other dementias and neurodegenerative disorders such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Moreover, we intend to study whether alterations in peripheral cells suffer parallel changes in the brain in a murine model of amyloidosis (Tg APP/PS1). Understanding the intimate involvement of cell signals in controlling cell-cycle checkpoints and apoptotic events in the molecular pathogenesis of AD might be important for diagnostic purposes and in particular, to search for neuroprotective strategies.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Bartolomé, F., Muñoz, U., Esteras, N., Bermejo-Pareja, F., Esteban, J., and Martín-Requero, A. (2009). Distinct regulation of cell cycle and survival in lymphocytes from Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2, 390-398.

Muñoz, U., Bartolomé, U., Bermejo, F., and Martín-Requero, A. (2008). Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol. Aging.* 29, 1474-1484.

Muñoz, U., Bartolomé, F., Esteras, N., Bermejo-Pareja, F., and Martín-Requero, A. (2008). On the mechanism of inhibition of p27 protein degradation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 3507-3519.

Sala, S.G., Muñoz, U., Bartolomé, F., Bermejo, F., and Martín-Requero, A. (2008). 3 HMG-CoA reductasa inhibitor, simvastatin, inhibits cell cycle progression at the G1-S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol lowering effects. *J. Exp. Ther. Pharmacol.* 324, 352-359.

Bartolomé, F., Cuevas, N., Muñoz, U., Bermejo, F., and Martín-Requero, A. (2007). Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca^{2+} /calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1437-1448.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=57





Carmelo Bernabeu Quirante
 Profesor de Investigación
 bernabeu@cib.csic.es

Ph.D., 1977.
 Universidad Autónoma de Madrid.
 Postdoctoral Scholar Molecular Biology Institute,
 (1980-1981).
 University of California, LA, USA.
 Research Fellow Dana-Farber Cancer Institute, (1982-
 1983).
 Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA
 Científico Titular, 1985.
 Investigador Científico, 1987.
 CIB, CSIC.
 Jefe de grupo, 1988.
 CIB
 Profesor de Investigación, 2003.
 CIB, CSIC.



Luisa-María Botella Cubells
 Investigadora Científica
 cibluisa@cib.csic.es

Ph.D., 1985.
 Universidad de Valencia.
 Visiting scientist, postdoctoral, (1986-1988).
 Genetiska Institutionen, Wallenberg Laboratory, Universidad
 de Lund, Suecia.
 Científica Titular, 1989 e Investigadora Científica, 2007.
 CIB, CSIC.

Investigador del equipo | Staff Scientist:

Eduardo Páez Abril

Patología Vascul y Hemostasia
 Vascular Pathology and Haemostasia

Receptores de TGF-β en células endoteliales TGF-β receptors in endothelial cells

Endoglin y ALK1 son miembros del complejo receptor de TGF-β en células endoteliales con implicaciones en la fisiopatología vascular. Mutaciones en los genes de endoglin o ALK1 (ACVLR1) son responsables de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), una enfermedad vascular autosómica dominante. Endoglin y ALK1 regulan la angiogenesis y homeostasis vascular, y una forma soluble de endoglin tiene un papel patogénico en preeclampsia. Además, endoglin es un marcador de la neoangiogenesis tumoral y es un supresor de tumores epiteliales.

Endoglin and ALK1 are components of the TGF-beta receptor complex in endothelial cells and they are involved in vascular physiopathology. Mutations in the endoglin or ALK1 (ACVLR1) genes give rise to Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), a dominant autosomic vascular dysplasia. Endoglin and ALK1 regulate angiogenesis and vascular homeostasis, and a soluble form of endoglin has a pathogenic role in preeclampsia. In addition, endoglin is a marker of tumour neoangiogenesis and it is a suppressor of epithelial tumours.

Nuestro laboratorio estudia la expresión génica, estructura y función de los receptores de TGF-β endoglin y ALK1, tanto en la fisiología normal como en el contexto de la patología humana, y en especial en HHT. Mutaciones en los genes de endoglin o ALK1 dan lugar a HHT1 y HHT2, respectivamente, las cuales están asociadas con frecuentes epistaxis, hemorragias gastrointestinales, telangiectasias cutáneas, y malformaciones arteriovenosas en pulmón, hígado y cerebro (OMIM #187300). Los estudios de expresión de las proteínas mutantes han establecido que la haploinsuficiencia explica las manifestaciones clínicas de la HHT, ya que la mayoría de las proteínas mutantes o bien no se expresan en la superficie celular, o no son funcionales. Entre los objetivos científicos del grupo se incluyen: i) Llevar a cabo el diagnóstico molecular de HHT mediante secuenciación de los exones de endoglin y ALK1 en la población de pacientes españoles; ii) Buscar nuevos biomarcadores en HHT; iii) Analizar los mecanismos de regulación transcripcional de los genes de endoglin y ALK1; iv) Obtener cultivos primarios de células endoteliales y monocitos activados a partir de sangre periférica de pacientes HHT para estudios de expresión genética, bioquímicos, de señalización celular y para ensayos de terapias célula-génicas en ratones; v) Analizar la función y los patrones de expresión génica de células transfectantes que sobreexpresan las dos isoformas de endoglin; vi) generar ratones transgénicos que sobreexpresen endoglin soluble y analizar el impacto en la hipertensión arterial; vi) Buscar medicamentos huérfanos con posible aplicación en HHT y estudiar su mecanismo de acción; vii) Estudiar la estructura tridimensional de los complejos de endoglin, ALK1 y miembros de la familia del TGF-β mediante microscopía electrónica.

The gene expression fingerprinting of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) and vascular biology

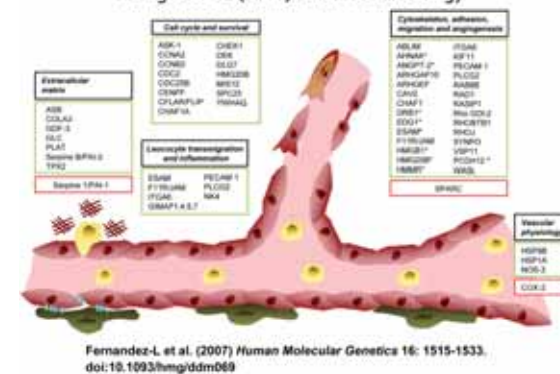


Fig. 1. Gene expression fingerprint of HHT and vascular biology. The diagram shows a vessel with some of the associated functional processes. The genes listed in the figure are involved in these vascular processes and they are deregulated in HHT cells. According to the literature, some of these genes may be involved in more than one physiological process and the asterisks indicate the genes that are very important for angiogenesis. Downregulated genes are in green boxes, while upregulated genes are in red boxes.

Our laboratory studies the expression, structure and function of the TGF-β receptors, endoglin and ALK1, in normal physiology and in the context of human pathology, and paying special attention to HHT. Mutations in endoglin or ALK1 genes give rise to HHT1 or HHT2, respectively, which are associated with frequent epistaxis, gastrointestinal hemorrhages, cutaneous telangiectasis and arteriovenous malformations in the lung, liver and brain (OMIM #187300). The mechanism of haploinsufficiency accounts for the clinical manifestations of HHT because most of the mutant proteins are either not expressed or they are non-functional. The scientific aims of our group are multiple and include: i) achieving a molecular diagnosis of HHT by sequencing endoglin and ALK1 exons from Spanish HHT patients; ii) searching for new biomarkers in HHT; iii) analysing the mechanisms of transcriptional regulation of endoglin and ALK1 genes; iv) generating primary cultures of endothelial cells and activated monocytes derived from blood samples of HHT patients to study gene expression, biochemistry, cell signalling and assays of cellulo-genetic therapies in mice; v) analysing the function of transfectant cells overexpressing the two endoglin isoforms; vi) the generation of transgenic mice overexpressing soluble endoglin and an analysis of the impact on arterial hypertension; vi) to search for orphan drugs with potential applications in HHT and to study their mechanisms of action; and vii) to study the three dimensional structure of endoglin, ALK1 and members of the TGF-β family using electron microscopy.

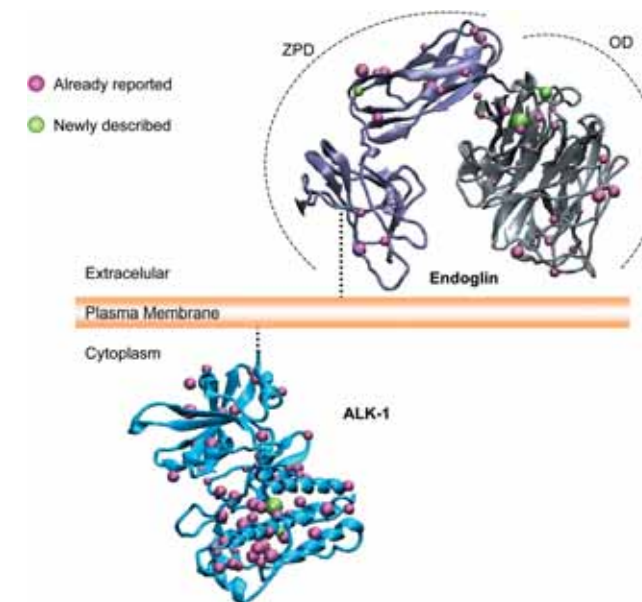


Fig. 2. Mutations in HHT genes. The missense mutations previously described in the extracellular part of endoglin and the intracellular part of ALK1 are shown as blue spheres. The new mutations described for both proteins appear as green spheres. The volume of the spheres is related to the size of the mutated residue side chain.



Publicaciones
 Seleccionadas
 Selected Publications

Blanco, F.J., Grande, M.T., Langa, C., Oujó, B., Velasco, S., Rodríguez-Barbero, A., Pérez-Gómez, E., Quintanilla, M., López-Novoa, J.M., and Bernabeu, C. (2008). 5-Endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ. Res.* 103, 1383-1392.

Santibañez, J.F., Blanco, F.J., Garrido-Martín, E.M., Sanz-Rodríguez, F., Del Pozo, M.A., and Bernabeu, C. (2008). Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. *Cardiovasc. Res.* 77, 791-799.

Fernández-L, A., Garrido-Martín, E.M., Sanz-Rodríguez, F., Pericacho, M., Rodríguez-Barbero, A., Eleno, N., López-Novoa, J.M., Düwelling, A., Vega, M.A., Bernabeu, C., and Botella, L.M. (2007). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1515-33.

Fernández-L, A., Garrido-Martín, E.M., Sanz-Rodríguez, F., Ramírez, J.R., Morales-Angulo, C., Zarrabeitia, R., Pérez-Molino, A., Bernabeu, C., and Botella, L.M. (2007). Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 97, 254-262.

Llorca, O., Trujillo, A., Blanco F.J., and Bernabeu, C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J. Mol. Biol.* 365, 694-705.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo_lineas.php?idgrupo=22

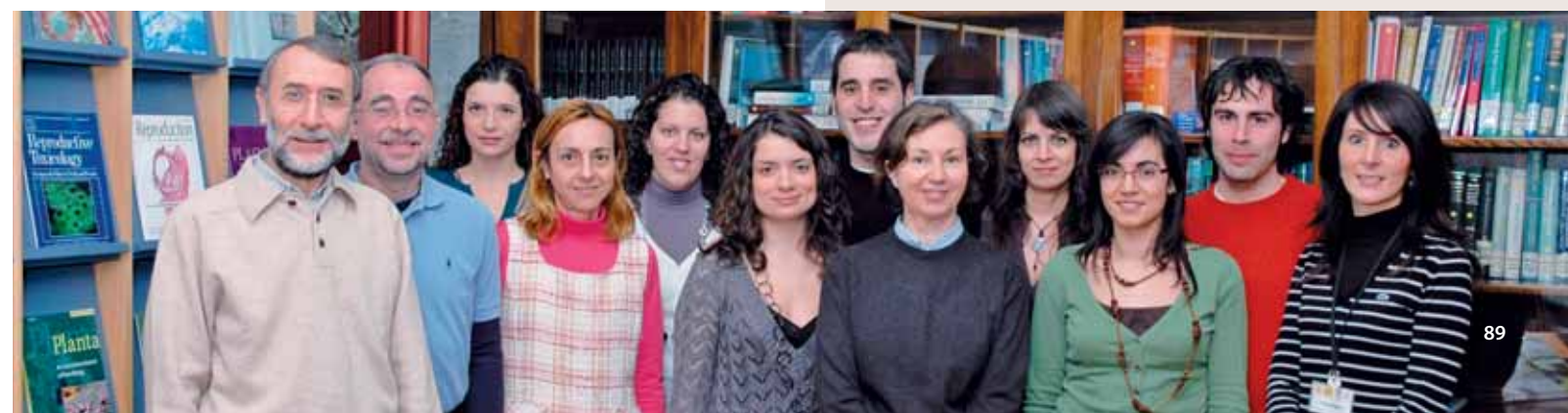


Patentes | Patents

- Letarte, M., Massagué, J., Bernabéu, C., and Cheifetz, S.
 "Use of endoglin polypeptides for modifying the regulatory activity of TGF-β".
 Fecha: 17 Febrero, 1998. Número de Patente: 5.719.120. Oficina de Patentes, USA.
 Licenciada a las empresas Nephromics y Biosite.
 - Letarte, M., Massagué, J., Bernabéu, C., and Cheifetz, S.
 "Soluble TGF-β-binding endoglin polypeptides and homodimers".
 Fecha: 3 Noviembre, 1998. Número de Patente: 5.830.847. Oficina de Patentes, USA.
 Licenciada a las empresas Nephromics y Biosite.
 - Ojeda, M.L., Barrios, L., Bernabeu, C., and Botella, L.M.
 "Método de detección de la telangiectasia hemorrágica hereditaria".
 Fecha de prioridad: Noviembre 2008. Número de solicitud Nacional: 200803174.

Otros Miembros | Other lab Members:

Francisco Javier Blanco López
 África Fernández López
 Virginia Albiñana Díaz
 Mikel Aristorena San Adrián
 Víctor Gerardo Franco Otero
 Nieves García Tejedor
 Eva María Garrido Martín
 Carmen Langa Poza
 María Luisa Ojeda Fernández
 Lucía Recio Poveda
 Elisa Rossi
 Ana Cristina Valbuena Díaz





Santiago Lamas Peláez
 Profesor de Investigación
 slamas@cib.csic.es

M.D., 1981.
 Universidad Autónoma de Madrid.
 Especialista en Nefrología, 1986.
 Ministerio de Sanidad y Consumo.
 Ph.D., Premio Extraordinario, 1989.
 Universidad Autónoma de Madrid.
 Fellow of Renal and Cardiovascular Division at Brigham & Women's Hospital, (1990-1992).
 Harvard Medical School, Boston, USA.
 Científico Titular, 1993.
 CIB, CSIC.
 Profesor de Investigación, 2005.
 CIB, CSIC.

Investigador del equipo | Staff Scientist:

Fernando Rodríguez Pascual

Otros Miembros | Other lab Members:

Mariano Redondo Horcajo
 Patricia Rodríguez Pérez
 Rosa Bretón Romero
 Oscar Busnadiégo Prieto
 Cecilia González de Orduña
 M^a Angeles Higuera López
 David Lagares Salto
 Clara López Jiménez
 Noemi Magán Marchal
 M^a Estrella Soría López

Patología Vasculay Hemostasia
 Vascular Pathology and Haemostasia

Fisiopatología Molecular de la Pared Vasculay

Molecular Pathophysiology of the Vascular Wall

Nuestro laboratorio investiga los mecanismos moleculares, bioquímicos y celulares que subyacen a la fisiopatología de la pared vascular. La disfunción endotelial es un proceso consustancial al desarrollo de diversas patologías vasculares como la aterotrombosis o la hipertensión o la diabetes. Este fenómeno se asocia con el hecho de que la capacidad endotelial para promover la relajación vascular e inhibir la agregación plaquetaria está dañada.

Our laboratory investigates the molecular, biochemical and cellular mechanisms that underlie the pathophysiology of the vascular wall. Endothelial dysfunction is inherently related to the development of vascular pathology in humans and it is associated to diseases such as atherotrombosis, hypertension or diabetic vascular disease. Such events result in impaired endothelial capacity to promote vascular relaxation and inhibit platelet aggregation.

Desarrollo de modelos animales de enfermedad vascular. Relevancia del eje TGF-β/ET-1 en la fisiopatología vascular. En el desarrollo de patologías vasculares, la descompensación entre depósito y degradación de matriz extracelular que se produce en los procesos fibróticos es fundamental. La fibrosis aparece en muchas enfermedades crónicas como aterosclerosis, esclerodermia o daño pulmonar intersticial. Aun cuando parte de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de fibrosis están bien establecidos, no se sabe como detener o suprimir este proceso. Para comprender el papel de los agentes profibróticos y vasoconstrictores en el daño vascular hemos desarrollado modelos de animales genéticamente modificados en relación con el eje TGFβ/ET-1. Estamos también interesados en la búsqueda de nuevos mecanismos de regulación del gen de la endotelina-1 a través de mecanismos de regulación postraduccionales sensibles al estado redox.

Papel funcional de las modificaciones post-traduccionales en proteínas de la pared vascular inducidas por estrés oxidativo y nitrosativo. Diversas modificaciones post-traduccionales específicas inducidas por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno han demostrado ser de gran importancia. Entre estas se incluyen la S-glutationilación, la S-nitrosilación y la nitración de tirosinas. Sin embargo el reto principal sigue siendo conocer que dianas específicas son fisiopatológicamente relevantes. Nuestro laboratorio ha contribuido en gran medida a la

identificación de estas modificaciones en células endoteliales y en proteínas aisladas. Estamos ahora interesados en aplicar estos conocimientos a modelos in vivo fisiopatológicos utilizando células, animales y pacientes.

Development of animal models of vascular disease. The relevance of the TGF-β/ET-1 axis in vascular injury. In the development of vascular disease, the balance between extracellular matrix degradation and deposition ultimately leads to the establishment or resolution of a fibrotic process. Fibrosis is central to many chronic diseases such as atherosclerosis, cirrhosis, scleroderma or interstitial lung damage. Even though some of the molecular mechanisms leading to fibrosis are well known, no clues are available to efficiently defer or suppress this process. In order to understand the role of pro-fibrotic and vasoconstrictive agents in vascular damage, we are developing genetically modified animals to address the role of the TGF-β-endothelin-1 axis. We are also investigating novel mechanisms of endothelin-1 gene regulation related to redox-mediated post-transcriptional regulation.

Functional role of post-translational protein modifications induced by oxidative and nitrosative stress in the vascular wall. Specific post-translational modifications promoted by reactive oxygen and nitrogen species significantly affect the vascular wall, including S-glutationylation, S-nitrosylation and tyrosine nitration. However, identifying the pathophysiologically relevant targets of these modifications is still a challenge. Our laboratory has contributed extensively to identify these modifications in endothelial cells and in isolated proteins. We would now like to apply the relevance of this knowledge to in vivo pathophysiological models of disease, using cells, animals and patients.

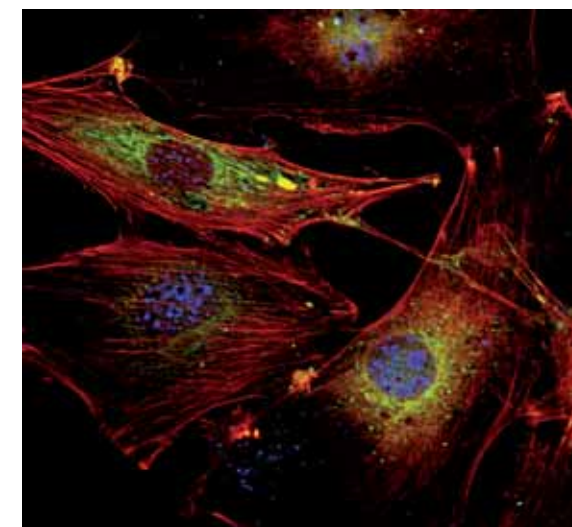


Fig. A.

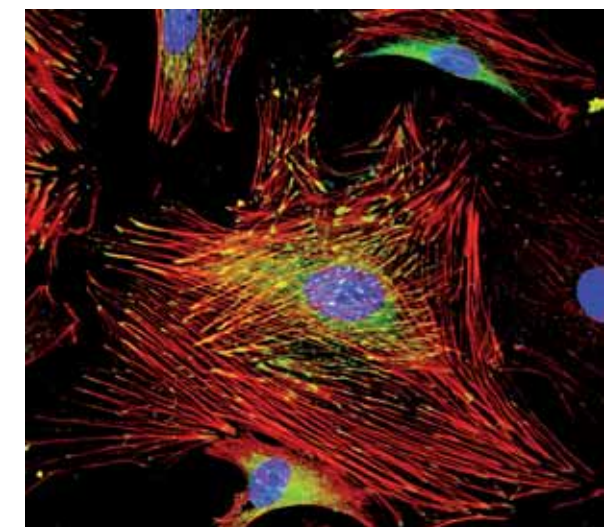


Fig. B.

Inducción de la diferenciación de fibroblastos (A) a miofibroblastos (B) por endotelina-1. Tinción con vinculina (verde) y faloidina (rojo). Cortesía de David Lagares.

Endothelin-1 induced differentiation of fibroblast (A) to myofibroblasts (B). Vinculin (green) and phalloidin (red) are shown. Courtesy of David Lagares.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Lizarbe, T.R., García-Rama, C., Tarin, C., Saura, M., Calvo, E., López, J.A., López-Otin, C., Folgueras, A.R., Lamas, S., and Zaragoza, C. (2008). Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J.* 22, 3207-3215.

Rodríguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M., Magán-Marchal, N., Lagares, D., Martínez-Ruiz, A., Kleinert, H., and Lamas S. (2008). Glycerolaldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* 28, 7139-7155.

Castañares, C., Redondo-Horcajo, M., Magán-Marchal, N., ten Dijke, P., Lamas, S., and Rodríguez-Pascual, F. (2007). Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J. Cell Sci.* 120, 1256-1266.

Martínez-Ruiz, A., and Lamas, S. (2007). Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutationylation: convergences and divergences. *Cardiovasc. Res.* 75, 220-228.

Navarro-Antolín, J., Redondo-Horcajo, M., Zaragoza, C., Álvarez-Barrientos, A., Fernández, A.P., León-Gómez, E., Rodrigo, J., and Lamas, S. (2007). Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 394-403.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=37





Roberto Parrilla Sánchez
 Profesor de Investigación
 rparrilla@cib.csic.es

M.D., 1964, y Ph.D., 1968.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral: (1969-1971) y (1971-1973).
 Universidad de Harvard y Universidad de Pennsylvania, EE UU.
 Científico Titular, 1971 y Investigador Científico, 1975.
 CSIC.
 Prof. Agregado, 1977.
 Universidad Autónoma de Madrid.
 Catedrático de Fisiología, 1981.
 Universidad de Extremadura.
 Profesor de Investigación, 1992.
 CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Matilde Sánchez Ayuso

Otros Miembros | Other lab Members:

Nora Viviana Butta Coll
 Darío Fernández
 Tomás Fontela Casado
 Elena García Arias-Salgado
 Adela García Martín
 Susana García Obregón
 Susana Larrucea Bilbao
 Adam Nowakowski

Patología Vascular y Hemostasia
 Vascular Pathology and Haemostasia

Fisiopatología de los Trastornos Hemostáticos

Physiopathology of Hemostasis Disorders

Las plaquetas son fragmentos circulantes anucleados de megacariocitos con actividades multifuncionales. En condiciones normales, tanto el endotelio vascular como las plaquetas producen factores pro- y anti-coagulantes de cuya proporción depende la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Además de tener una función hemostática, las plaquetas juegan un papel importante en inflamación, trombosis, reconocimiento celular, reendotelización de células vasculares o en la unión a células tumorales, contribuyendo a la formación de metástasis.

Platelets are circulating anucleated fragments of megakaryocytes that exhibit multifunctional activities. Under normal conditions, both the vascular endothelium and the platelets produce pro- and anticoagulant factors, the patency of blood vessels depending on the relevant proportions of these agents. Besides their hemostatic function, platelets play an important role in inflammation, thrombosis, cellular recognition, reendotheliasation of damaged endothelial vascular cells, or in binding tumour cells contributing to the formation of metastasis.

El trabajo del grupo ha estado enfocado al estudio de tres proteínas plaquetarias: el ligando (*CD154*) del receptor CD40, miembro de la familia de receptores TNF; podocalicina (*PODXL*) de la familia de proteínas del CD34; y la quinasa ligada a integrinas (*ILK*) y su papel en la vía de señalización de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Para estudiar la función de estas tres proteínas hemos desarrollado el marcaje condicional de genes que permite la ablación específica de tejido de cada una de estas proteínas.

Algunas de las conclusiones de este trabajo han sido:

- Células tumorales que expresan *PODXL* o células que sobreexpresan *PODXL* recombinante humana muestran incremento en su capacidad de adhesión, extensión y migración sobre ligandos inmovilizados así como su interacción con células del endotelio vascular y con plaquetas.

- Hay una correlación entre niveles circulantes de *sCD154* y estado de activación de las plaquetas, como se muestra en plaquetas aisladas de pacientes carentes de *CD154* (síndrome de hiper-IgM ligada al cromosoma X) o con niveles plasmáticos elevados de *sCD154* (enfermedad de Crohn).
- El análisis proteómico de las plaquetas de pacientes con episodios de trombosis arterial muestra una disminución de algunas proteínas. Una de ellas, *ILK*, asociada a balsas lipídicas de membrana.
- Generación de modelos animales:
 - Ratones portadores de los genes *CD154* o *PODXL* "floxed", es decir con fragmentos de DNA flanqueados por secuencias LoxP.
 - Ratones que expresan la recombinasa Cre específicamente en megacariocitos y plaquetas
 - Ablación de la expresión de *ILK* específicamente en megacariocitos y plaquetas.

Our work has been focused on the study of three platelet proteins: the ligand (*CD154*) that binds to the CD40 receptor, which is a member of the TNF family of receptors; podocalyxin (*PODXL*), from the CD34 family of cell surface proteins; and the role played by *ILK* in $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ signalling pathways. To study the functional role of these proteins we have carried out conditional gene targeting to achieve tissue specific knockdown of each of these proteins.

Some of our achievements have been to demonstrate that:

- The enhanced adherence, spreading and migration onto immobilized extracellular ligands of tumour cells inherently expressing *PODXL* or cells expressing recombinant human *PODXL*, as well as their interaction with vascular endothelial cells and platelets. These effects were dependent on the degree of sialylation of the membrane proteins.
- A correlation exists between circulating levels of *sCD154* and the state of platelet activation, as shown in platelets isolated from patients with no *CD154* (X-linked hyper-IgM syndrome) or with elevated plasma *sCD154* (Crohn's disease).
- Platelets from patients with arterial thrombotic episodes show a consistent decrease in certain proteins, one of which, *ILK*, appears to be associated with lipid rafts.
- The animal models we have generated include: mice carrying recombinant floxed *PODXL* or *CD40L* genes; mice specifically expressing the transgene of the recombinase Cre in megakaryocytes and platelets, as well as a conditional *ILK* knock-out in megakaryocytes to study its repercussion on platelet function.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Arias-Salgado, E.G., Larrucea, S., Butta, N., Fernández, D., García-Muñoz, S., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (2008). Variations in Platelet Proteins Associated with Arterial Thrombosis. *Thromb. Res.* 122, 640-647.

Larrucea, S., Butta, N., Arias-Salgado, E.G., Alonso-Martín, S., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2008). Expression of podocalyxin enhance the adherence, migration, and intercellular communication of cells. *Exp. Cell Res.* 314, 2004-2015.

Wei, C., Möller, C.C., Altintas, M.M., Li, J., Schwarz, K., Zacchigna, S., Xie, L., Henger, A., Schmid, H., Rastaldi, M.P., Cowan, P., Kretzler, M., Parrilla, R., Bendayan, M., Gupta, V., Nikolic, B., Kalluri, R., Carmeliet, P., Mundel, P., and Reiser, J. (2008). Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat. Med.* 14, 55-63.

Larrucea, S., Butta, N., Rodríguez, R.B., Alonso-Martín, S., Arias-Salgado, E.G., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2007). Podocalyxin enhances the adherence of cells to platelets. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 2965-2974.

Butta, N., Arias-Salgado, E.G., González-Manchón, C., Ferrer, M., Larrucea, S., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2003). Disruption of the beta3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to beta3 integrins. *Blood* 102, 2491-2497.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=??????

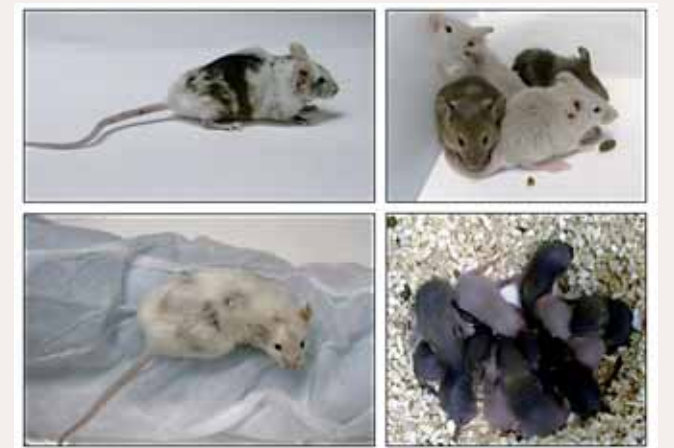


Fig. 1. Ratones knock out condicionales. Ratones quiméricos obtenidos mediante inserción de un alelo recombinante (floxed) en células embrionarias y su agregación con cigotos en estadio de mórula.
Conditional knock out mice. Chimeric mice generated by genomic insertion of a recombinant (floxed) allele into embryonic stem cells that are incorporated into a morula stage zygote.



Consuelo González Manchón
Científica Titular
cgmanchon@cib.csic.es

M.D., 1983.
Universidad de Extremadura.
Ph.D., 1987.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, 1988.
Salk Institute, La Jolla, CA, USA.
Investigadora contratada, 1991.
CIB.
Científica Titular, 1999.
CIB, CSIC.
Jefa de Grupo, 2005.
CIB.

Investigador del equipo | Staff Scientist:

Pedro Lastres Varo

Otros Miembros | Other lab Members:

Isabel Conde Martín
Asier Jayo Andrés
Dina Patricia Pabón Realpe

Patología Vasculay Hemostasia
Vascular Pathology and Haemostasia

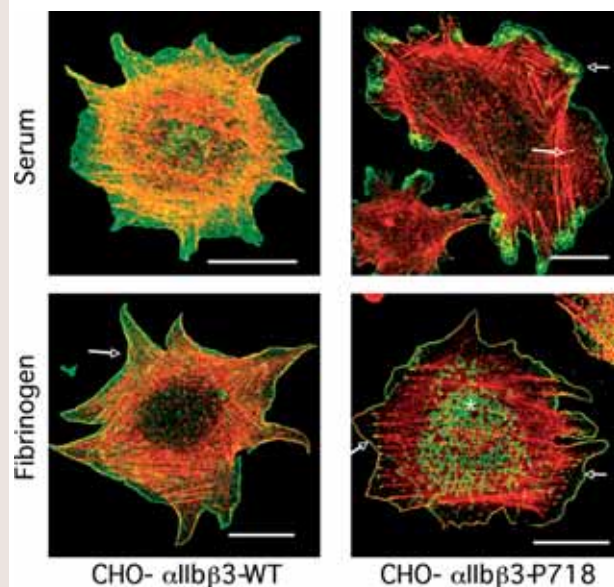
Receptores de Membrana Plaquetarios Platelet Membrane Receptors

Nuestra actividad investigadora ha estado dirigida a la caracterización de las bases genéticas y moleculares de enfermedades hemostáticas, en concreto de las relacionadas con disfunción de los receptores plaquetarios. Utilizando plaquetas y modelos celulares diseñados en el laboratorio, investigamos la relación entre los cambios estructurales y las alteraciones funcionales de dichas receptores, con el fin de descifrar los mecanismos moleculares implicados en su papel en hemostasia y trombosis.

Our research addresses the genetic and molecular basis of haemostatic diseases, specifically related to platelet receptor dysfunction. Using platelets and by designing cellular models, we investigate the relationships between structural changes and functional perturbations to elucidate the molecular mechanisms underlying their role in haemostasia and thrombosis.

Fig. 1. "Clustering" de la integrina α IIb β 3. Las células que expresan la integrina mutante α IIb β 3-P718 muestran un patrón atípico de "clustering" tras su adhesión a fibrinógeno.

Clustering of α IIb β 3 integrin. Cells expressing the mutant α IIb β 3-P718 integrin show atypical clustering upon adhesion to fibrinogen.



Actualmente estudiamos diferentes aspectos de los dos receptores más abundantes en la membrana plaquetaria, la integrina α IIb β 3 (principal receptor de fibrinógeno) y el complejo GPIb-IX (receptor del factor de von Willebrand), incluyendo.

- Su análisis estructural y funcional en enfermedades humanas (tromboastenia de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier, respectivamente), con especial interés en la caracterización de receptores disfuncionales que se expresan en superficie en cantidades normales. Utilizando modelos celulares, estamos estudiando también el efecto del reagrupamiento de α IIb β 3 en la redistribución de los lípidos de membrana y en la señalización de fuera adentro ("outside-in" signaling) mediada por la integrina.
- Caracterización y consecuencias funcionales de la interacción trombina-GPIb-IX. Recientemente, hemos reportado que esta interacción promueve la fijación de fibrina polimerizante a la integrina α IIb β 3, sugiriendo un nuevo papel de la fibrina en una ruta alternativa de agregación plaquetaria. Planeamos explorar dicha interacción en contextos más fisiológicos, como la adhesión celular en condiciones de flujo controladas.
- Regulación de la diferenciación megacariocítica terminal y papel del complejo GPIb-IX en este proceso. Nos proponemos aclarar las rutas de señalización involucradas en la expresión de los marcadores megacariocíticos de superficie así como en el proceso de apoptosis dependiente de diferenciación terminal.

Recientemente, estamos ampliando nuestro trabajo a otra molécula muy abundante en la plaqueta, el FXIIIc o forma celular del factor XIII plasmático, transglutaminasa que también se expresa en monocitos y células dendríticas. Planeamos estudiar el papel de la actividad de "crosslinking" del FXIIIc en la oligomerización de receptores de agonistas plaquetarios.

We are currently focused on different aspects of the two more abundant platelet membrane receptors, the α IIb β 3 integrin (the main fibrinogen receptor) and the GPIbIX complex (the von Willebrand factor receptor). Along these lines, we carry out:

- A structure and function analysis of the receptors in human diseases (Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome, respectively), with particular interest in characterizing dysfunctional receptors that are normally expressed at the cell surface. Using model systems, we are currently studying the effect of α IIb β 3 clustering on membrane lipid redistribution and integrin-mediated outside-in signalling.
- The characterization and functional consequences of the thrombin-GPIb-IX interaction. We recently reported that this interaction promotes the binding of polymerizing fibrin to α IIb β 3 integrin, suggesting a novel role for fibrin in an alternative platelet aggregation pathway. We now plan to explore the functional consequences of this interaction in more physiological contexts, such as that of cell adhesion under controlled flow conditions.
- Studies on the regulation of terminal megakaryocytic differentiation and the role of the GPIb-IX complex to elucidate the signalling pathways involved in the surface expression of megakaryocyte markers, as well as those implicated in terminal differentiation-dependent apoptosis.

We are recently extending our work to other molecules strongly expressed by platelets, such as FXIIIc (the cellular form of plasma factor XIII), a transglutaminase that is also expressed in monocytes and dendritic cells. We plan to investigate the role of FXIIIc crosslinking activity on platelet agonist receptor oligomerization.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Jayo, A., Arnold, E., González-Manchón, C., Green, D., and Lord, S.T. Hypodysfibrinogenemia causing mild bleeding and thrombotic complications in a compound heterozygote of A α IVS4+1G>T and A α 4841DelC truncation (A α Perth). **Thromb. Haemost.** In press

Jayo, A., Conde, I., Lastres, P., Jiménez-Yuste, V., and González-Manchón C. New insights into the expression and role of platelet FXIII-A. **J. Thromb. Haemost.** In press.

Silva, N., Dutzan, N., Hernández, M., Dezerega A., Rivera, O., Aguillon, J.C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R., and Gamonal, J. (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. **J. Clin. Periodontol.** 35, 206-214.

Jayo, A., Pabón, D., Lastres, P., Jiménez-Yuste, V., and González-Manchón, C. (2006). Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the α IIb gene. A novel missense mutation in exon 27. **Haematologica** 91, 1352-1359.

Pabón, D., Jayo, A., Xie, J., Lastres, P., and González-Manchón, C. (2006). Thrombin induces GPIb-IX-mediated fibrin binding to α IIb β 3 in a reconstituted Chinese hamster ovary cell model. **J. Thromb. Haemost.** 4, 2238-2247.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=59

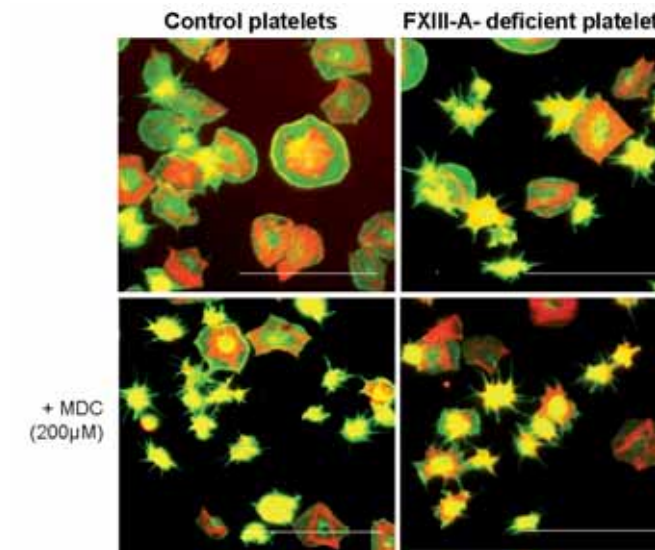


Fig. 2. El FXIII-A modula la extensión de las plaquetas. Plaquetas controles tratadas con un inhibidor de transglutaminasas (MDC), así como plaquetas carentes de FXIII-A presentan un fenotipo de extensión alterado, con un mayor porcentaje de plaquetas que emiten filopodios respecto a las que muestran lamelas.

FXIII-A modulates platelet spreading. The spreading of control platelets treated with a transglutaminase inhibitor (MDC) and of FXIII-A-deficient platelets is altered with a higher proportion of platelets emitting filopodia rather than lamellipodia.

CIB

ÍNDICE

Control de la Expresión Génica y Propagación Génica en Bacterias

Control of Gene Expression and Gene Propagation in Bacteria

Manuel Espinosa y Alicia Bravo	100
Gloria del Solar	102
Ramón Díaz Orejas	104
Paloma López	106

Células Inmunes Innatas en la Inflamación y en la Interacción Patógeno-Hospedador

Innate Immune Cells in Inflammation and Host-Pathogen Interaction

Ángel Corbí y Miguel Angel Vega	108
José Luis Rodríguez Fernández (Emergente)	116

Expresión Génica en Infecciones Microbianas

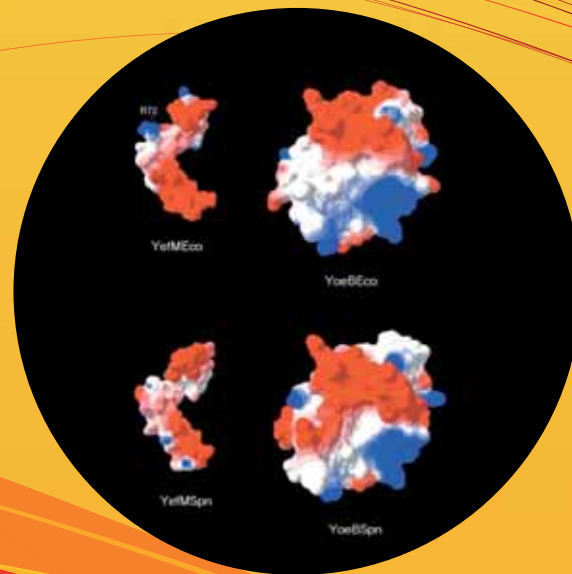
Gene Expression in Microbial Infections

Vicente Larraga	110
María Colmenares	
Sara I. Pérez Prieto y Silvia Rodríguez Saint-Jean	112

Interacciones Huésped-Parásito en Infecciones Neumocócicas

Host Parasite Interplay in Pneumococcal Infection

Ernesto García y Pedro García	114
-------------------------------	-----



Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones

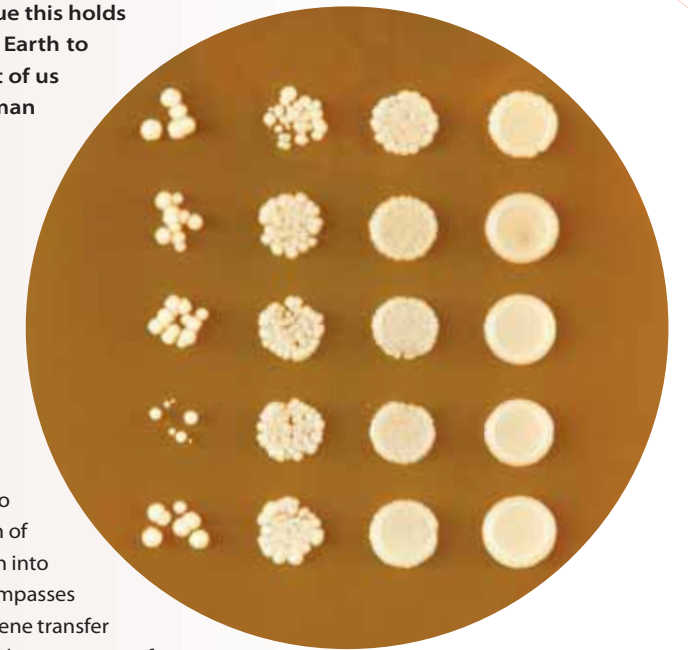
Hace más de un siglo, Louis Pasteur declaró: "Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot", y cuán verdadera continúa siendo su frase. De hecho, estamos en la faz del planeta Tierra gracias a los microbios y la mayoría de nosotros abandonaremos el planeta por causa de ellos, ya que la mayoría de las enfermedades y muertes de seres humanos se deben a infecciones microbianas.

Así, podemos de veras decir que la comprensión plena del mundo microbiano nos permitirá comprender a la biosfera y nuestro papel en el planeta. Dado que: i) los seres humanos tenemos, al menos, 10 veces más células procarióticas en nuestro cuerpo que células eucarióticas; ii) la mayoría de las enfermedades humanas y las tasas de mortalidad se deben a infecciones microbianas, y iii) necesitamos a los microorganismos para llevar una vida saludable, podemos concluir que más nos vale conocerlos y comprenderlos. Además, la comprensión de los procesos vitales solamente se alcanzará cuando comprendamos el mundo microbiano y los mecanismos que los gobiernan. En el CIB, el anterior Departamento de Microbiología Molecular albergó a la mayoría, pero no a todos, de los científicos que trabajan en varios aspectos de la Microbiología: desde la Biotecnología y Microbiología Ambiental hasta Expresión Génica y Genética Bacteriana. Sin embargo, es ya tiempo de renovar los objetivos y de focalizar mejor el trabajo de modo que se adecuen mejor al nuevo Plan Estratégico del CIB. De esta manera, se ha creado una nueva Línea de Investigación sobre Microbiología Molecular y Biología de Infecciones (MMIB) que incluye a diversos grupos que trabajan en varios aspectos del control de la expresión génica, de la transferencia genética, y de la biología de infecciones. La MMIB estará focalizada en estudios moleculares sobre microorganismos -y sus elementos móviles- y en su influencia en la salud humana. Los diferentes grupos de MMIB tiene experiencia demostrada en trabajos moleculares, genéticos, bioquímicos, biofísicos, bioinformáticos y estructurales, de modo que les expectativas son la creación de un nuevo, mejor y más compacto entorno científico que, en su momento, conducirá a una mejor comprensión de los principios moleculares que subyacen en procesos y mecanismos pato-fisiológicos que podrán ser susceptibles de ser transferidos al sector industrial. Los grupos integrantes de MMIB están trabajando activamente en expresión génica y su regulación, virulencia y su control, fisiología y metabolismo, comunicación celular y rutas de señalización, y en transferencia genética. La investigación se ha estructurado en cuatro sublíneas: i) Expresión génica en infecciones microbianas; ii) Control de la expresión y transferencia génicas en bacterias; iii) Inmunidad celular innata en la inflamación y relaciones huésped-patógeno, y iv) Interacciones huésped-parásito en infecciones pneumocócicas. Las dos primeras sublíneas intentan alcanzar una mejor comprensión de los mecanismos que gobiernan la expresión génica microbiana y la respuesta global a estímulos externos, mientras que las otras dos sublíneas están más focalizadas en estudios huésped-patógeno durante la infección. El *leitmotif* de MMIB será alcanzar la meta última de la ciencia, que es el conocimiento de los **mecanismos** que gobiernan los procesos biológicos en el mundo microbiano lo que, a su vez, significa la comprensión de las inter-relaciones y procesos globales de la vida.

Molecular Microbiology and Infection Biology

Over one hundred years ago, Louis Pasteur declared: "Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot", and how true this holds today! In fact, we owe our presence on the face of Earth to microbes as we need microbes to remain healthy, and most of us will also leave the Earth because of them since most human diseases and deaths are due to microbial infections.

Thus, we can really say that fully understanding microbes will allow us to understand the biosphere and our role on the planet Earth. Indeed, we humans have at least 10 times more prokaryotic cells on our body than eukaryotic ones and thus, understanding how to remain healthy during our lifetime will be best achieved by understanding the microbial world and the events that govern it. At the CIB, most but not all the scientists working on various aspects of Microbiology were housed within the former Department of Molecular Microbiology, covering issues from Biotechnology and Environmental Microbiology to Gene Expression and Bacterial Genetics. However, when the need to renovate the objectives in this field arose, to the new Strategic Plan of the CIB better focused these issues, creating a novel line of research into Molecular Microbiology and Infectious Biology (MMIB) that encompasses the groups working on aspects of the control of gene expression, gene transfer and infectious biology. The MMIB focuses on the molecular aspects of microorganisms and their mobile elements, as well as on their influence on human health. The different groups in the MMIB programme have expertise in molecular genetics, biochemistry, biophysics, bioinformatics and structural studies, such that this novel, improved and more compact scientific environment should help advance our understanding of the molecular principles underlying basic patho-physiological processes and mechanisms. Such progress is also likely to generate knowledge that is suitable for transfer to industry. The groups associated with the MMIB are actively working on gene expression and regulation, virulence and its control, physiology and metabolism, cell-to-cell communication and signalling pathways, and gene transfer. Accordingly, the research carried out in the MMIB is structured into four main sub-programmes that deal with: i) Gene expression in microbial infections; ii) The control of gene expression and gene propagation in bacteria; iii) Innate immune cells in inflammation and host-pathogen interactions; and iv) Host-parasite interplay in pneumococcal infection. The first two sub-programmes aim to better understand the mechanisms that control microbial gene expression and global responses to external stimuli, whereas the last two focus on host-pathogen interactions during infection. The *leitmotif* of the MMIB programme is to achieve the ultimate goal in science, which is to understand the **mechanisms** governing the processes in the microbial world that will in turn help us to understand the networks and global processes of life.





Manuel Espinosa Padrón
Profesor de Investigación
mespinosa@cib.csic.es

Dr. en Ciencias, 1969.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, 1974.
Universidad de Groningen, Holanda.
Postdoctoral, (1979-1980).
Instituto de Bioquímica y Biofísica, Polonia.
Postdoctoral, (1980-1982).
Brookhaven National Laboratory, USA.
Científico Titular y Jefe de Grupo desde 1984.
Profesor de Investigación, 1990.
CIB, CSIC.
Director en funciones del CIB (1992-1993).
Miembro de EMBO desde 1996.



Alicia Bravo García
Científica Titular
abravo@cib.csic.es

Dra. en Ciencias Biológicas, 1988.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, (1988-1990).
Max-Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin, Alemania.
Postdoctoral, (1991-2005). CBM "Severo Ochoa", CSIC.
Contrato 'Ramón y Cajal', (2002-2005). CBMSO.
Contrato 'Ramón y Cajal', (2005-2007). CIB.
Científica Titular, 2007. CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Luis Fabián Lorenzo Díaz
Inmaculada Moreno Córdoba
Concepción Nieto Mazarrón
Wai Ting Chan
Lorena Rodríguez González
Sofía Ruiz Cruz
Virtudes Solano Collado

Control de la Expresión Génica y Propagación Génica en Bacterias
Control of Gene Expression and Gene Propagation in Bacteria

Expresión Génica y Transferencia Genética en Bacterias

Bacterial Gene Expression and Gene Transfer

Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y por *Enterococcus faecalis* causan millones de muertes de humanos al año. Ambas bacterias son patógenos oportunistas y con capacidad de transferencia genética horizontal. La persistencia y antibiótico-tolerancia de muchas bacterias parece estar mediada por sistemas proteicos cromosómicos denominados de Toxina-Antitoxina (TA). Muchos genes de virulencia de pneumococos y enterococos están regulados por reguladores globales denominados 'stand alone' porque carecen de una quinasa asociada.

Infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and by *Enterococcus faecalis* cause millions of human deaths each year. Both bacterial species are opportunistic pathogens with the capacity to participate in horizontal gene transfer. Persistence and multi-drug tolerance of many bacteria are thought to be related to chromosomally-encoded proteic Toxin-Antitoxin (TA) systems. Indeed, many virulence genes are regulated by global transcriptional regulators that are defined as 'stand alone' because they lack an associated kinase.

Se trabaja en: 1.- Movilización conjugativa de pMV158 mediada por la proteína MobM codificada por el plásmido. Interacciones entre MobM con el origen de transferencia, *oriT*, donde se inicia la transferencia conjugativa; el *oriT* se localiza en una región altamente estructurada del plásmido y se ubica a 5' del inicio del gen *mobM*. Cercano al *oriT* se encuentra un origen de replicación de cadena retrasada, *ssuU*, que juega un importante papel en la transferencia conjugativa inter-específica. Construcción de vectores para *S. pneumoniae* y otras bacterias Gram-positivas, algunos de ellos marcados con la proteína fluorescente verde (M. Espinosa). 2.- Estudiamos dos de los varios operones cromosómicos de *S. pneumoniae* que codifican sistemas TA: *relBE* y *yefM/yoeB*. Las antitoxinas (RelB, YefM) se asocian con y neutralizan a las correspondientes toxinas (RelE, YoeB), y el complejo TA auto-regula su propia síntesis. Ambas toxinas son inhibidores del crecimiento, no sólo de pneumococos sino de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. Los sistemas TA podrían participar en la tolerancia antibiótica y persistencia de las infecciones (C. Nieto). 3.- Reguladores globales de virulencia de *S. pneumoniae* y de *E. faecalis*. Se pretende la caracterización funcional y estructural de las proteínas *Spn-Mga* de *S. pneumoniae* y EfaA y EfaB de *E. faecalis* mediante: (i) identificación de sus genes diana; (ii) mecanismo de regulación transcripcional y (iii) análisis del mecanismo(s) implicado(s) en la transducción de las señales que modulan su expresión y/o actividad. (A. Bravo). Colaboraciones: M. Coll, F.G. del Portillo, R. Díaz-Orejás, J. Casadesús, C.C. Yeo, J. Schildbach, R. Lurz.

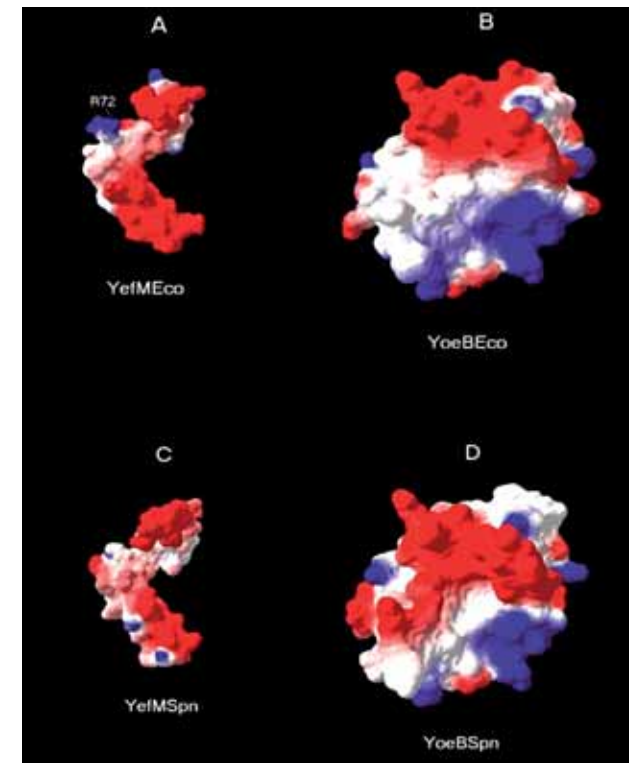


Fig. 1. Potenciales electrostáticos de superficie de los dominios de interacción de las antitoxinas YefMEco (A) y YefMSpn (C, modelo) con sus correspondientes toxinas YoeB, y potenciales electrostáticos de superficie de las toxinas YoeBEco (B) y YoeBSpn (D, modelo). Las cargas positivas están en azul y las negativas en rojo. (Nieto et al. (2007) *J. Bacteriol.* 189, 1266-1278).

Surface electrostatic potentials of the interaction domains of the antitoxins YefMEco (A) and YefMSpn (C, model), with their cognate YoeB toxins and the surface electrostatic potentials of the toxins YoeBEco (B) and YoeBSpn (D, model). Positive potentials are in blue and negative potentials in red. (Nieto et al. (2007) *J. Bacteriol.* 189, 1266-1278).



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Serrano-Heras, G., Bravo, A., and Salas, M. (2008). Phage Φ 29 protein p56 prevents viral DNA replication impairment caused by uracil excision activity of uracil-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 19044-19049.

Alonso, J.C., Balsa, D., Cherny, I., Espinosa, M. (Chapter coordinator), Francuski, D., Gazit, E., Gerdes, K., Hitchin, E., Martín, M.T., Nieto, C., Overweg, K., Pellicer, T., Saenger, W., Welfle, K., Welfle, H., and Wells, J. (2007). Bacterial Toxin-Antitoxin Systems as Targets for the Development of Novel Antibiotics. In: R.A. Bonomo and M.E. Tomalsky, eds. Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. *ASM Press, Washington DC*, pp. 313-329.

Nieto, C., Cherny, I., Khoo, S.K., García de Lacoba, M., Chan, W.T., Yeo, C.C., Gazit, E., and Espinosa, M. (2007). The yefM-yoeB toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. *J. Bacteriol.* 189, 1266-1278.

Ruiz-Masó, J.A., Lurz, R., Espinosa, M., and del Solar, G. (2007). Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication. *Nucl. Acids Res.* 35, 1230-1244.

Serrano-Heras, G., Ruiz-Masó, J. A., del Solar, G., Espinosa, M., Bravo, A., and Salas, M. (2007). Protein p56 from the *Bacillus subtilis* phage Φ 29 inhibits DNA-binding ability of uracil-DNA glycosylase. *Nucl. Acids Res.* 35, 5393-5401.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=45

We focus our work on the conjugative transfer of plasmid pMV158 mediated by the plasmid-encoded MobM protein. Interactions between MobM with its cognate origin of transfer, *oriT*, occur where transfer initiates. This *oriT* is situated in a highly structured region and it is located 5' of the *mobM* gene start codon. A lagging-strand replication origin, *ssuU*, is located near *oriT*, which plays an important role in interspecies plasmid transfer. We are constructing plasmid vectors, useful for *S. pneumoniae* and other Gram-positive bacteria, some of which are tagged with the gene encoding the green fluorescent protein (M. Espinosa). Two of the several chromosomal operons of *S. pneumoniae* encode the TA systems: *relBE* and *yefM/yoeB*. Antitoxins (RelB, YefM) associate with and neutralize the toxic effect of their cognate toxins (RelE, YoeB), and the TA complex regulates their own synthesis. Both these toxins are potent inhibitors of bacterial cell growth, not only for pneumococci but also for the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. Thus, TA systems could participate in antibiotic-tolerance and in infection persistence (C. Nieto). We are also interested in the global regulatory proteins involved in *S. pneumoniae* and *E. faecalis* virulence. Hence, we are functionally and structurally characterizing the *Spn-Mga* (*S. pneumoniae*), and the EfaA and EfaB (*E. faecalis*) proteins by: (i) identifying their target genes; (ii) identifying their mechanism of transcriptional regulation; and (iii) analysing the signal transduction pathways that modulate their expression and/or activity (A. Bravo). Collaborations: M. Coll, F.G. del Portillo, R. Díaz-Orejás, J. Casadesús, C.C. Yeo, J. Schildbach, R. Lurz.

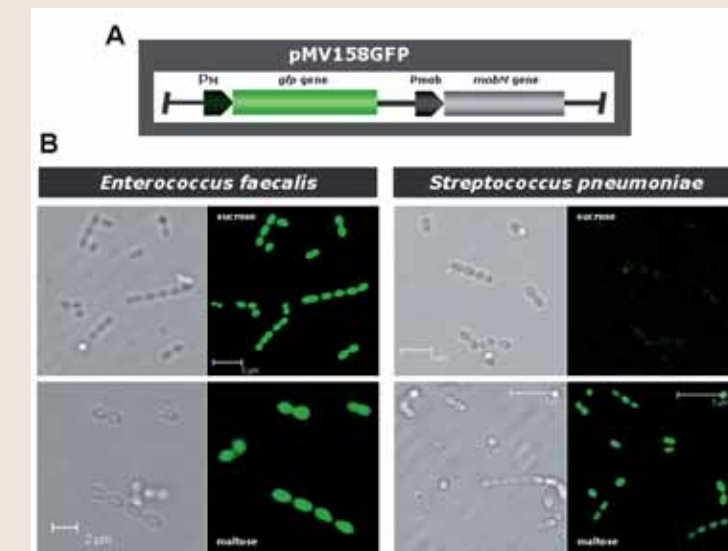


Fig. 2. Microscopía de contraste de fases y de fluorescencia de células de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae* que portan el plásmido pMV158GFP. Este plásmido expresa el gen *gfp* bajo el control del promotor PM, inducible por maltosa. (Lorenzo-Díaz and Espinosa, (2009). *J. Bacteriol.* 191, 720-727).

Phase-contrast and fluorescence microscopy of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring the plasmid pMV158GFP. The plasmid contains the *gfp* gene under the control of the maltose-inducible promoter PM (Lorenzo-Díaz and Espinosa (2009). *J. Bacteriol.* 191, 720-727).



Gloria del Solar
Investigadora Científica
gdelsolar@cib.csic.es

Ph.D., 1991.
Universidad Complutense de Madrid.
Científica Titular, 2002.
CSIC.
Jefe de grupo, 2003.
CIB.
Investigadora Científica, 2009.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

José Ángel Ruiz-Masó
Celeste López Aguilar
Tania Samir Rubio Lepe

Control de la Expresión Génica
y Propagación Génica en Bacterias
Control of Gene Expression and Gene Propagation in Bacteria

Replicación y Expresión del DNA en Bacterias Gram-positivas

Replication and Expression of DNA in Gram-positive Bacteria

El plásmido pMV158 replica por "círculo rodante" y exhibe un amplísimo rango de huésped. La proteína RepB, iniciadora de la replicación, se une específicamente al locus *bind* del origen, y corta una cadena del DNA en un sitio concreto, dentro del locus *nic*. La replicación se controla mediante dos elementos que inhiben la síntesis de RepB: el represor transcripcional CopG, y el RNAII "antisense", que actúa a nivel postranscripcional.

Plasmid pMV158 replicates by the rolling-circle mechanism and it exhibits a very broad host-range. The replication initiator protein, RepB, binds specifically to the *bind* locus of the origin and it cleaves the DNA strand at a precise site within the *nic* locus. Replication is controlled by two elements that inhibit RepB synthesis: the transcriptional repressor CopG, and the antisense RNAII that acts at the post-transcriptional level.

RepB. En colaboración con los grupos de Miquel Coll (IBMB, CSIC), Oscar Llorca y Pablo Chacón (CIB, CSIC) se ha obtenido la estructura atómica del hexámero de RepB (Fig. 1), así como la reconstrucción 3D de la proteína libre y unida al DNA del locus *bind*. RepB presenta dos dominios: el N-terminal o catalítico, y el C-terminal o de oligomerización. En el hexámero de RepB, los dominios catalíticos se disponen formando dos trímeros separados por un surco, en tanto que los dominios C-terminales forman un anillo con simetría senaria atravesado por un canal central. El DNA del locus *bind* parece unirse por la región de los dominios N-terminales. Trabajamos en la elaboración de un modelo de actuación *in vivo* de RepB que integre las propiedades estructurales y funcionales de la proteína.

CopG reprime la iniciación de la transcripción mediante un doble mecanismo: impide la formación del complejo RNAP-promotor, y es capaz de disociar el complejo abierto. La capacidad de CopG para disociar los complejos estables RNAP-promotor podría deberse al pequeño tamaño del represor, a su unión preferencial a la mitad derecha del elemento simétrico del operador, y a su unión cooperativa al resto de los sitios.

Antisense. Se han construido RNA "antisense" mutantes con alteraciones de secuencia en



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Álvarez-Martín, P., Flórez, A.B., Margolles, A., del Solar, G., and Mayo, B. (2008). Improved cloning vectors for bifidobacteria based on the Bifidobacterium catenulatum pBC1 replicon. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 4656-4665.

Ruiz-Masó, J.A., Lurz, R., Espinosa, M., and del Solar, G. (2007). Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication. **Nucl. Acids Res.** 35, 1230-1244.

Ruiz-Masó, J.A., Lurz, R., Espinosa, M., and del Solar, G. (2007). The double-strand origin of plasmid pMV158 revisited: RepB initiator interacts with two distinct DNA regions. **Plasmid** 57, 187-188.

Serrano-Heras, G., Ruiz-Masó, J.A., del Solar, G., Espinosa, M., Bravo, A., and Salas, M. (2007). Protein p56 from the Bacillus subtilis phage Φ 29 inhibits DNA-binding ability of uracil-DNA glycosylase. **Nucl. Acids Res.** 35, 5393-5401.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=50

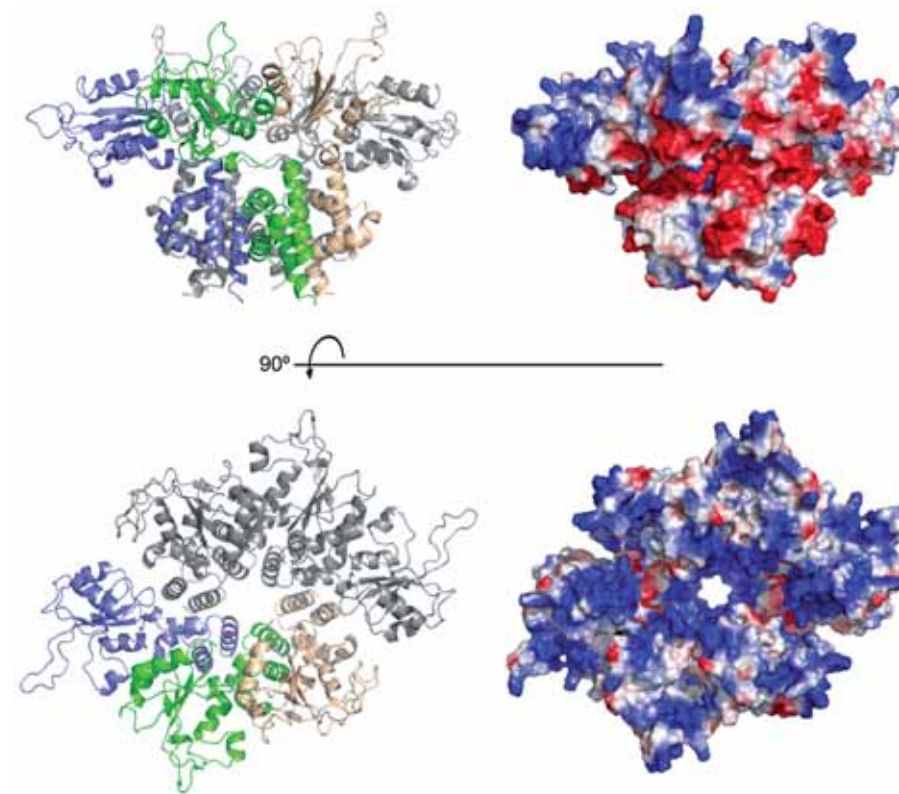


Fig. 1. Dos vistas diferentes de la estructura 3D y del potencial electrostático de superficie del hexámero de RepB. Las regiones electropositivas se muestran en azul, y las electronegativas en rojo.

Two different views of the 3D structure and the electrostatic surface potential of the RepB hexamer. Positive potential regions are in blue and negative potential regions in red.

distintas regiones. Una región desapareada del extremo 5' del "antisense" parece tener un papel fundamental en la afinidad y velocidad de asociación con el mRNA_{cop-rep} (en colaboración con Alfredo Berzal, IPB, CSIC), así como en la inhibición tanto de la traducción de *repB* *in vitro* como de la replicación *in vivo* de pMV158 (Fig. 2).

RepB. The atomic structure of hexameric RepB (Fig. 1) and the 3D reconstructions of the protein, both unbound and bound to the DNA of the *bind* locus, have been obtained in collaboration with the groups of Miquel Coll (IBMB), Oscar Llorca and Pablo Chacón (CIB, CSIC). RepB has an N-terminal catalytic domain and a C-terminal oligomerization domain. In hexameric RepB, the catalytic domains are arranged as two trimers separated by a crevice, whereas the C-terminal domains form a six-fold symmetrical ring with a central channel. The *bind* locus seems to bind through the N-terminal domain region. A model for the *in vivo* role of RepB might be envisaged by integrating the structural and functional features of the protein.

CopG represses transcription initiation through a dual mechanism, by preventing the formation of the RNAP-promoter complex and by dissociating the open complex. The ability of CopG to dissociate stable RNAP-promoter complexes may arise from its small size, its preferential binding to the right half of the symmetric element of the operator, and to its cooperative binding to other sites.

Antisense RNA mutants with sequence substitutions in several regions have been obtained. An unpaired region in the 5'-end of the antisense seems to have an important influence on the affinity and rate of association to the *cop-rep* mRNA (collaboration with Alfredo Berzal, IPB, CSIC), as well as on the inhibition of both *in vitro* translation of *repB* and *in vivo* replication of pMV158 (Fig. 2).

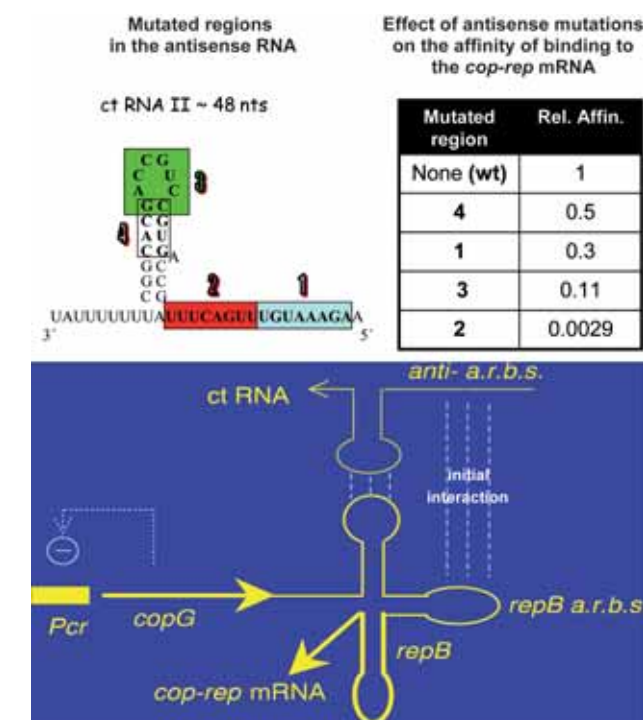


Fig. 2. Efecto de la alteración de secuencia en distintas regiones del RNA "antisense" sobre la afinidad de unión al mRNA *cop-rep*. Se muestra el modelo propuesto para la interacción inicial entre el "antisense" y el mRNA.

Effect of sequence alterations in different regions of the antisense RNA on the affinity of binding to the *cop-rep* mRNA. A model for the initial interaction between the antisense RNA and mRNA is shown.



Ramón Díaz Orejas
 Profesor de Investigación
 ramondiaz@cib.csic.es

Dr. CC. Químicas, Bioquímica, 1977.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Pre y Posdoctorales: (1974-1978).
 Universidad de Leicester.
 Pre y Posdoctorales: (1979-1980).
 UK, Universidad de Odense, DK.
 Pre y Posdoctorales: (1975-1981).
 Instituto Max-Planck de Genética Molecular, Berlin, Alemania.
 Científico Titular, 1979.
 CSIC.
 Jefe de Grupo desde 1981.
 CIB.
 Investigador Científico, 1989.
 Profesor de Investigación, 2004.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Ana María Hernández-Arriaga
 Elizabeth Diago Navarro
 Juan López Villarejo
 Alicia Rodríguez Bernabé

Control de la Expresión Génica
 y Propagación Génica en Bacterias
 Control of Gene Expression and Gene Propagation in Bacteria

Sistemas Toxina-Antitoxina Bacterianos

Bacterial Toxin-Antitoxin Systems

Nuestro grupo estudia la regulación, función e interrelaciones modulares de sistemas toxina-antitoxina (TA) bacterianos que juegan un papel en la estabilidad de elementos genéticos extracromosómicos y en la respuesta a estrés. Estos estudios se focalizan en el sistema antitoxina-toxina *parD (kis, kid)* del factor de resistencias a antibióticos de enterobacterias R1 descubierto en nuestro laboratorio, el primer sistema descrito de una extensa familia que se encuentran en distintos plásmidos y cromosomas bacterianos.

Our group studies the regulation, function and modular interactions between toxin/antitoxin (TA) systems in plasmids and chromosomes of bacteria. TA systems participate in plasmid stability and in response to stress. Our studies focus on the *parD (kis, kid)* system of plasmid R1, a TA system discovered in our laboratory and the first known member of an extensive family of TA systems found in bacterial plasmids and chromosomes.

Los sistemas TA son biosensores de estrés basados en el juego de una antitoxina inestable y una toxina estable cuya activación induce parada de crecimiento y eventualmente puede llevar a pérdida de viabilidad. Estos efectos están relacionados con su papel en respuesta a estrés y en mantenimiento de la información genética.

Nuestros estudios más recientes se han centrado en la regulación y actividad del sistema TA *kis-kid* del plásmido R1. Hemos progresado, en colaboración con grupos nacionales e internacionales, en la caracterización estructural y funcional de los componentes y complejos relevantes del sistema. La toxina Kid ha sido identificada como una endorribonucleasa de corte definido que puede interferir con la síntesis de proteínas y otros procesos dependientes de RNA; su estructura ha sido determinada y su mecanismo de acción definido. La estructura de la toxina y un RNA sustrato se ha modelado y el modelo ha sido evaluado mediante el análisis de mutantes clave en unión o rotura del RNA. El papel diferencial de complejos toxina antitoxina, en la neutralización de la toxina y en la regulación del sistema se ha definido. También hemos establecido el potencial de este sistema para inhibir selectivamente la proliferación de líneas celulares específicas en eucariotas. Estos resultados suponen el punto

de partida para los estudios que realizamos actualmente y que exploran aspectos singulares relacionados con la regulación, actividad y función de este sistema, sus interrelaciones con sistemas homólogos y sus implicaciones en la diseminación o persistencias de resistencias antibióticas o de determinantes de virulencia en bacterias.

TA systems are stress biosensors that act on the basis of the interplay between an unstable antitoxin and a stable toxin. Decay of the antitoxin activates the toxin, interfering with cell growth/viability of the host, reflecting the complex effects of these systems on plasmid stability and stress responses. Our recent studies focus on the regulation and activity of the *kis-kid* system of the R1 plasmid. In collaboration with other national and international groups, we have progressed in defining the structure and function of this TA system, and we have established the structure, activity and mode of action of the Kid toxin as a specific endoribonuclease and protein synthesis inhibitor. The complex of the Kid toxin and an RNA substrate, and the mechanism of RNA cleavage have been defined. Likewise, the differential roles of TA complexes in neutralizing the Kid toxin and in the regulation of the system have been established, as well as the potential of the Kis and Kid protein to selectively target particular cell lines in eukaryotes. These results define the starting point for studies that now focus on specific aspects of the regulation, activity and function of this system, and of its homologous chromosome. We are also exploring the relationship of these systems with the persistence of antibiotic resistance and virulence determinants in bacteria.

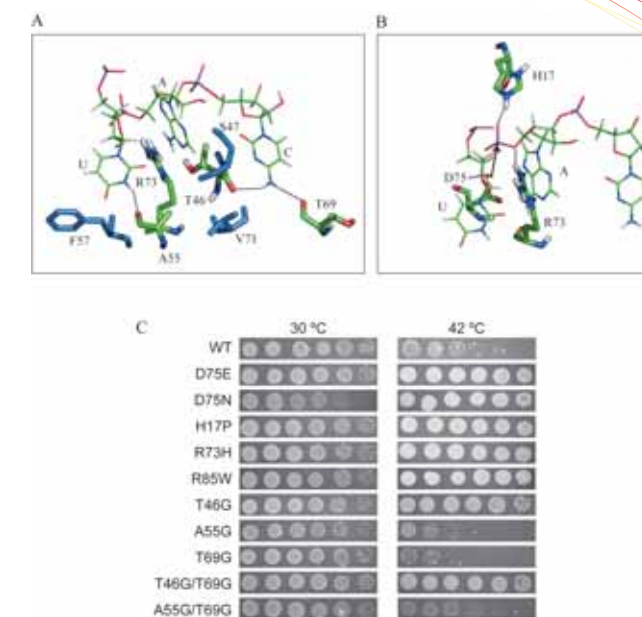


Fig. 1. Residuos de la ribotoxina Kid implicados en corte (A) y unión específica al RNA (B). (C) Efectos de mutaciones en residuos del sitio de corte o de unión específica al RNA de la toxina Kid, en la inhibición de crecimiento bacteriano. Residuos in the Kid ribotoxin involved in RNA cleavage (A) and specific binding (B). (C) The effect of the mutation of residues involved in RNA cleavage or binding on the growth inhibition mediated by the Kid toxin.

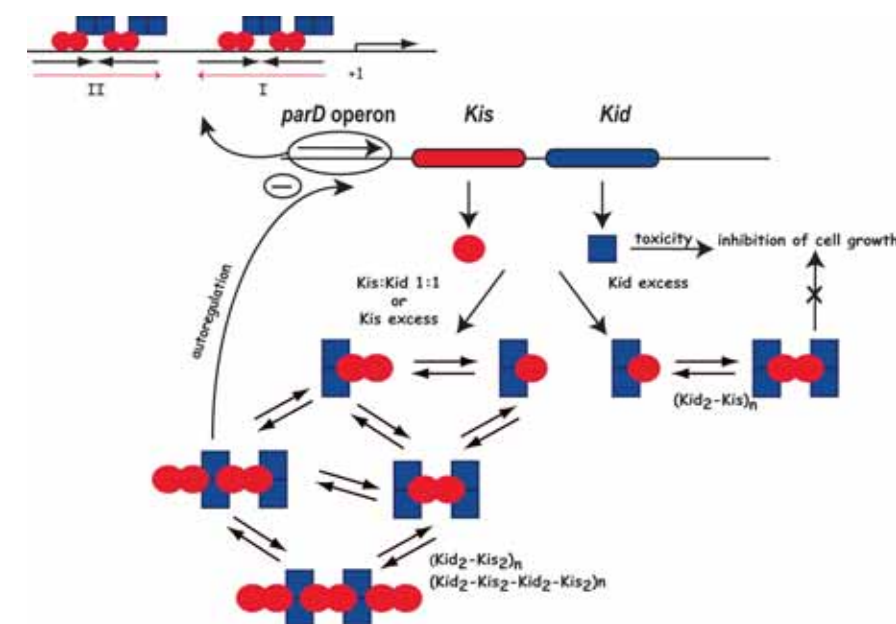


Fig. 2. Regulación transcripcional del sistema *parD (kis, kid)* del plásmido R1 por su componentes, la toxina Kid y la antitoxina Kis. Model of transcriptional regulation of the *parD (kis, kid)* operon of plasmid R1 by the Kid toxin and the Kis antitoxin.



Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications

Diago-Navarro, E., Mora, L., Backingham, R., Díaz-Orejas, R., and Lemonnier, M. (2008). Novel *E. coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE. **Mol Microbiol** 71, 66-78, 2009.

Kamphuis, M.B., Monti, M.C., van den Heuvel, R.H., Santos Sierra, S., Lemnier, M., Díaz-Orejas, R., Heck, A.J., and Boelens, R. (2007) Interactions between the toxin Kid of the bacterial *parD* system and the antitoxins Kis and MazE. **Proteins** 67, 219-231.

Monti, M.C., Hernández-Arriaga, A.M., Kamphuis, M.B., López-Villarejo, J., Heck, A.J.R., Boelens, R., Díaz-Orejas, R., and van den Heuvel, R.H. (2007). Interactions of Kis-Kid toxin-antitoxin

complexes with the *parD* operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid-Kis oligomers. **Nucl. Acids Res.** 35, 1737-1749.

Kamphuis, M.B., Bovin, A.M., Monti, M.C., Lemonnier, M., Muñoz-Gómez, A., van den Heuvel, R.H., Díaz-Orejas, R., and Boelens, R. (2006). Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. **J. Mol. Biol.** 357, 115-126.

Muñoz-Gómez, A.J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A., and Díaz-Orejas, R. (2005). RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. **J. Bacteriol.** 187, 3151-3157.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=9



Paloma López García
Investigadora Científica
plg@cib.csic.es

Ph.D., 1978.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, (1979-1980).
Institute of Biochemistry and Biophysic, Polish Academy of Science, Varsovia, Poland.
Postdoctoral, (1982-1983).
Brookhaven National Laboratory, Upton, USA.
Científica Titular, 1985.
CSIC.
Jefa de grupo, 1987.
CIB.
Investigadora Científica, 1992.
CIB, SIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

Pilar Fernández de Palencia Delgado

Otros Miembros | Other lab Members:

Mónica Amblar Estéban
Nieves García Quintans
Begoña Jiménez Castillo
M^a Ángeles Corrales González
M^a Luz Mohedano Bonillo
Cristina Quevedo Sierra
M^a Laura Werning



**Control de la Expresión Génica
y Propagación Génica en Bacterias**
Control of Gene Expression and Gene Propagation in Bacteria

**Biología Molecular de Bacterias
Gram-positivas**
**Molecular Biology of Gram positive
Bacteria**

Las bacterias Gram-positivas incluyen microorganismos tanto patógenos como beneficiosos para el hombre. Por ello, nuestro grupo está caracterizando a nivel molecular: 1) sistemas regulatorios esenciales de *Streptococcus pneumoniae* con el objetivo de desarrollar drogas terapéuticas frente a este patógeno, y 2) rutas metabólicas de interés biotecnológico de bacterias lácticas y sus interacciones con células intestinales humanas con el objetivo de mejorar la calidad de los alimentos y desarrollar alimentos funcionales.

The Gram-positive bacteria include both pathogens and microorganisms that are beneficial to human beings. Therefore, our group characterizes the regulatory systems essential for *Streptococcus pneumoniae* at the molecular level in order to develop anti-infective agents against this human pathogen. In addition, we are studying the metabolic pathways of industrial interest in the lactic acid bacteria with the aim of improving food quality, and of developing probiotic bacteria and prebiotic agents for the elaboration of functional food.

Nuestro grupo está estudiando el mecanismo de regulación y modo de acción del sistema de dos componentes YycFG sobre la expresión de genes esenciales, mediante una aproximación genómica y proteómica y estudios de interacción DNA-proteína y proteína-proteína (Fig. 1). Las proteínas YycF and YycG están siendo utilizadas como sistema modelo, con el objetivo de desarrollar una nueva clase de drogas antiinfectivas. Esta línea de investigación se enmarca dentro del proyecto 3554-DEADBUGS coordinado por la empresa farmacéutica laboratorios SALVAT (Barcelona) y en colaboración con grupos holandeses.

Nuestro grupo también está estudiando un nuevo tipo de β -glucanos producido por bacterias lácticas (BAL). Estamos caracterizando a nivel bioquímico la glicosiltransferasa GTF, que sintetiza este exopolisacárido (EPS). El conocimiento obtenido con esta investigación está siendo utilizado para realizar ingeniería metabólica y desarrollar BAL recombinantes productoras del β -glucano. Los EPS producidos están siendo purificados con el objetivo de generar sustratos para estudios inmunológicos en colaboración con el Dr. Angel Corbí (CIB). Además, nuestro grupo está analizando nuevas BAL productoras de EPS. Su viabilidad en el tracto digestivo y su resistencia al estrés gástrico está siendo evaluada *in vitro*, en presencia o ausencia de EPS. Esta línea de trabajo se enmarca dentro del proyecto español AGL2006-11932-C05 coordinado por el CIB. Este proyecto promueve el estudio de EPS y de sus bacterias productoras aisladas de alimentos y bebidas, incluyendo la evaluación de sus propiedades prebióticas y probióticas así como de su comportamiento durante la evaluación de alimentos funcionales.

Our group is applying a global genomic and proteomic approach to study the regulation and the mode of action of the YycFG two component system in essential gene expression, as well as employing DNA-protein and protein-protein interaction studies (Fig. 1). The *S. pneumoniae* YycF and YycG proteins are being used as model systems, with the aim of developing a new class of anti-infective drugs. This work programme falls within the framework of the project 3554-DEADBUGS, led by the pharmaceutical company SALVAT Laboratories (Barcelona) in collaboration with Dutch groups. Our group is also studying a new type of β -glucan produced by lactic acid bacteria (LAB). We are biochemically characterising the GTF glycosyltransferase that synthesises this exopolysaccharide (EPS).

The knowledge obtained is being used to develop recombinant β -glucan producing LAB via metabolic engineering and the resulting products are being purified. The aim of this work is to provide substrates for immunological testing in collaboration with Prof. Angel Corbí (CIB). In addition, our group is analyzing new EPS-producing LAB, evaluating their viability in the digestive track and their resistance to gastric stress *in vitro*, in the presence or absence of their EPS. This research falls within the project grant AGL2006-11932-C05 coordinated by the CIB. This project involves the study of EPS that are isolated from food and beverages, and of the bacteria producing them, evaluating their prebiotic and probiotic properties as well as their behaviour during the elaboration of functional food.

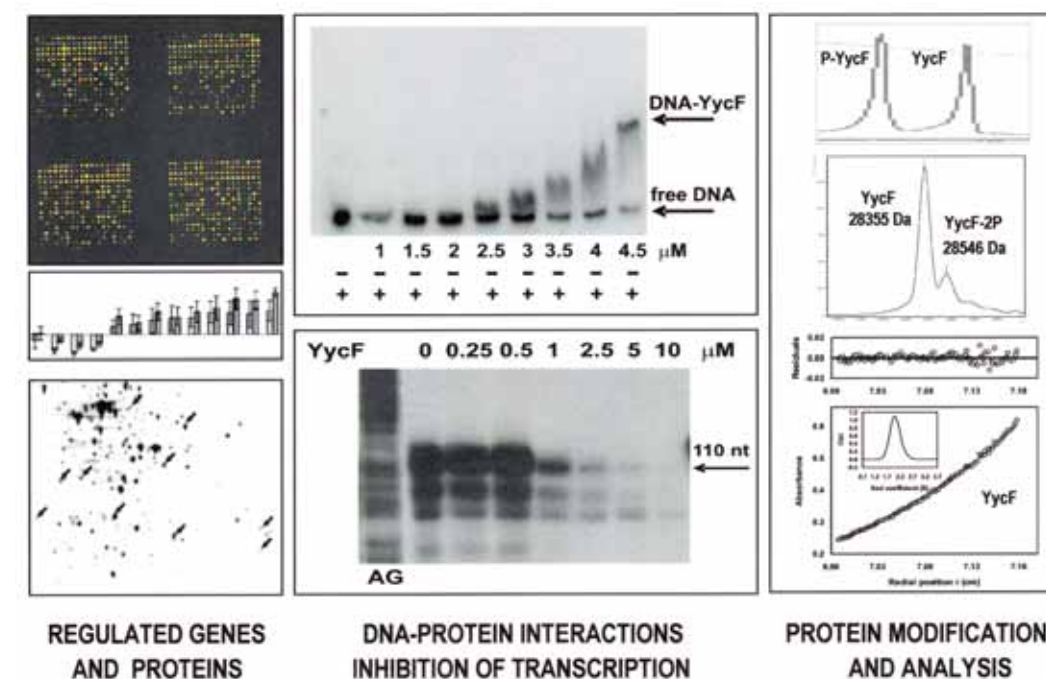


Fig. 1. Análisis de la regulación de la expresión génica mediada por YycFG. / Analysis of regulation of gene expression mediated by YycFG.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., García-Quintans, N., Martínez-Bueno, M., López, P., and Maqueda, M. (2008). Processing of the as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. **J. Bacteriol.** 190, 240-250.

García-Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C., and López, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. In: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. Edited by Mayo, B., López, P., Pérez-Martín, G. Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications, edited by by B. Mayo, P. López P., and G. Pérez-Martín. Research Signpost, Kerala, India.

García-Quintans, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., and López, P. (2008). Activation of diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 1988-1996.

Werning, M.L., Corrales, M.A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., and López, P. (2008). Heterologous expression of a 2-substituted-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 5259-5262.

Altabe, S., López, P., and de Mendoza, D. (2007). Isolation and characterization of unsaturated fatty acid auxotrophs of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mutants*. **J. Bacteriol.** 189, 8139-8144.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=41



Patentes | Patents

- López, P., Werning, M.L., Irastorza, A., Dueñas, M.T., Ibarburu I. and Navas, J. Fecha de prioridad: 2004.

"Secuencias, vectores y células GTF y sus aplicaciones en el sector alimentario."
Número de patente Nacional: 200402175. Número de solicitud Internacional: PCT/ES2005/070127.



Angel Luis Corbí López
 Profesor de Investigación
 acorb@cb.csic.es

Ph.D., Universidad Complutense de Madrid, 1985.
 Postdoctoral, (1985-1987), Dana Farber Cancer Institute, Center for Blood Research (1987-1989), Harvard Medical School, Boston, USA y Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Madrid (1989-1990).
 Adjunto, Unidad de Biología Molecular, (1991-1994), Hospital de la Princesa, Madrid.
 Científico Titular IPBLN, 1994. CSIC.
 Investigador Científico, 2001. CIB.
 Profesor de Investigación, 2003. CIB, CSIC.



Miguel Angel Vega Palacios
 Investigador Científico
 mavega@cb.csic.es

Ph.D., 1987. Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA (1988-1990) y Centro de Biología Molecular UAM-CSIC, Madrid, 1991.
 Adjunto, Unidad de Biología Molecular, (1992-1994), Hospital de la Princesa, Madrid.
 Científico Titular, IPBLN, 1994. CSIC.
 Investigador Científico, 2008. CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Noemí Aguilera Montilla
- Sonia Chamorro Pérez
- Ángeles Domínguez Soto
- Carmen Sánchez Torres
- Laura Aragonese Fenoll
- Angela Rey Gallardo
- Elena Sierra Filardi

Células Inmunes Innatas en la Inflamación y en la Interacción Patógeno-Hospedador
Innate Immune Cells in Inflammation and Host-Pathogen Interaction

Biología de Células Mieloides

Myeloid Cell Biology

Los macrófagos y las células dendríticas son células presentadoras de antígeno "profesionales" cuya actividad es fundamental para la iniciación y resolución de procesos inflamatorios y para la generación de respuestas inmunitarias antígeno-específicas. Los macrófagos, además, son células efectoras finales de la inmunidad adaptativa, contribuyendo tanto a la eliminación de agentes infecciosos como al mantenimiento de la integridad y la homeostasis tisular

Dendritic cells and macrophages are antigen-presenting cells that initiate and resolve inflammatory processes, and they critically contribute to the generation of antigen-specific immune responses. Macrophages are also the ultimate effector cells of adaptive immunity, and they contribute to the elimination of infectious and harmful material, and to the re-establishment of the tissue integrity and homeostasis.

Las líneas de investigación actuales del grupo pretenden contribuir a la determinación de la base molecular de 1) el reconocimiento y la captura de microorganismos patógenos por células dendríticas y macrófagos; 2) la participación de células dendríticas y macrófagos en la resolución de procesos inflamatorios y el mantenimiento de la homeostasis celular; y 3) los procesos de migración de ambos tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios y patogénicos. Para ello, nuestro grupo 1) analiza la expresión tejido-específica, la especificidad de ligandos y la capacidad señalizadora de la familia de receptores de patógenos relacionados con DC-SIGN, que media la detección y captura de numerosos patógenos de relevancia clínica (HIV, *Mycobacterium*, *Candida*, *Aspergillus*, *Leishmania*); 2) disecciona los mecanismos transcripcionales que gobiernan los procesos de maduración de células dendríticas y la activación de macrófagos, con objeto de diseñar herramientas diagnósticas que permitan definir el poder pro- y anti-inflamatorio de las células mieloides tisulares en condiciones homeostáticas y patológicas; y 3) investiga el papel de la adición post-traduccional de ácido polisialílico sobre las funciones efectoras esenciales de células dendríticas maduras (migración hacia nódulos linfáticos secundarios, formación de sinapsis inmunológica y activación y polarización de linfocitos T).

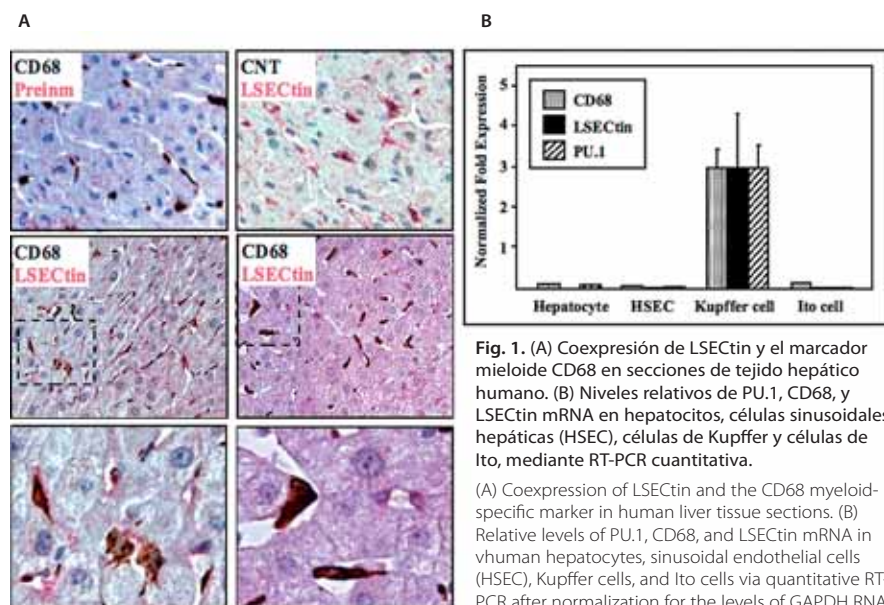


Fig. 1. (A) Coexpresión de LSECtin y el marcador mieloides CD68 en secciones de tejido hepático humano. **(B)** Niveles relativos de PU.1, CD68, y LSECtin mRNA en hepatocitos, células sinusoidales hepáticas (HSEC), células de Kupffer y células de Ito, mediante RT-PCR cuantitativa. **(A)** Coexpression of LSECtin and the CD68 myeloid-specific marker in human liver tissue sections. **(B)** Relative levels of PU.1, CD68, and LSECtin mRNA in vhuman hepatocytes, sinusoidal endothelial cells (HSEC), Kupffer cells, and Ito cells via quantitative RT-PCR after normalization for the levels of GAPDH RNA.



Our current research is aimed at determining the molecular basis that underlies the ability of macrophages and dendritic cells to sense and capture pathogenic microorganisms. We are also interested in defining the ability of macrophages and dendritic cells to contribute to inflammatory processes and to the maintenance of tissue homeostasis in the steady state. Indeed, the migratory activity of both cell types in response to pathogenic and inflammatory stimuli is being studied. To address these issues, our group analyzes the regulated expression, ligand specificity and signalling capacity of the DC-SIGN family of C-type lectin pathogen receptors, which mediate the sensing and capture of clinically relevant viral (HIV), bacterial (*Mycobacterium*), fungal (*Candida*, *Aspergillus*) and parasite (*Leishmania*) pathogens. We also attempt to dissect out the transcriptional events that govern dendritic cell maturation and macrophage activation, with the aim of designing diagnostic genomic tools to define the inflammatory state of tissue myeloid cells under homeostatic and pathological conditions. Finally we are investigating how post-translational addition of polysialic acid affects critical effector functions of mature dendritic cells (migration to lymphoid organs, formation of immunological synapses with T lymphocytes, T cell activation and polarization).



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Domínguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Clària, J., García-Monzón, C., Bustos, M., and Corbí, A.L. (2008). The pathogen receptor liver and lymph node sinusoidal endothelial C-type lectin is expressed in human Kupffer cells and regulated by PU.1. **Hepatology** 49, 287-296.

Serrano-Gómez, D., Sierra-Filardi, E., Martínez-Núñez, R.T., Caparrós, E., Delgado, R., Muñoz-Fernández, M.A., Abad, M.A., Jiménez-Barbero, J., Leal, M., and Corbí, A.L. (2008). Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. **J. Biol. Chem.** 283, 3889-3903.

Domínguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Martín-Gayo, E., Martínez-Prats, L., Colmenares, M., Naranjo-Gómez, M., Borrás, F.E., Muñoz, P., Zubiaur, M., Toribio, M.L., Delgado,

R., and Corbí, A.L. (2007). The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. **Blood** 109, 5337-5345.

Serrano-Gómez, D., Martínez-Núñez, R.T., Sierra-Filardi, E., Izquierdo, N., Colmenares, M., Pla, J., Rivas, L., Martínez-Picado, J., Jiménez-Barbero, J., Alonso-Lebrero, J.L., González, S., and Corbí, A.L. (2007). AM3 modulates dendritic cell pathogen recognition capabilities by targeting DC-SIGN. **Antimicrob Agents Chemother.** 51:2313-2323.

Caparrós, E., Muñoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gómez, D., Puig-Króger, A., Rodríguez-Fernández, J.L., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M., and Corbí, A.L. (2006). DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. **Blood** 107, 3950-3958.

Ver más en: www.cb.csic.es/grupo.php?idgrupo=????????



Vicente Larraga
Profesor de Investigación
vlarraga@cib.csic.es

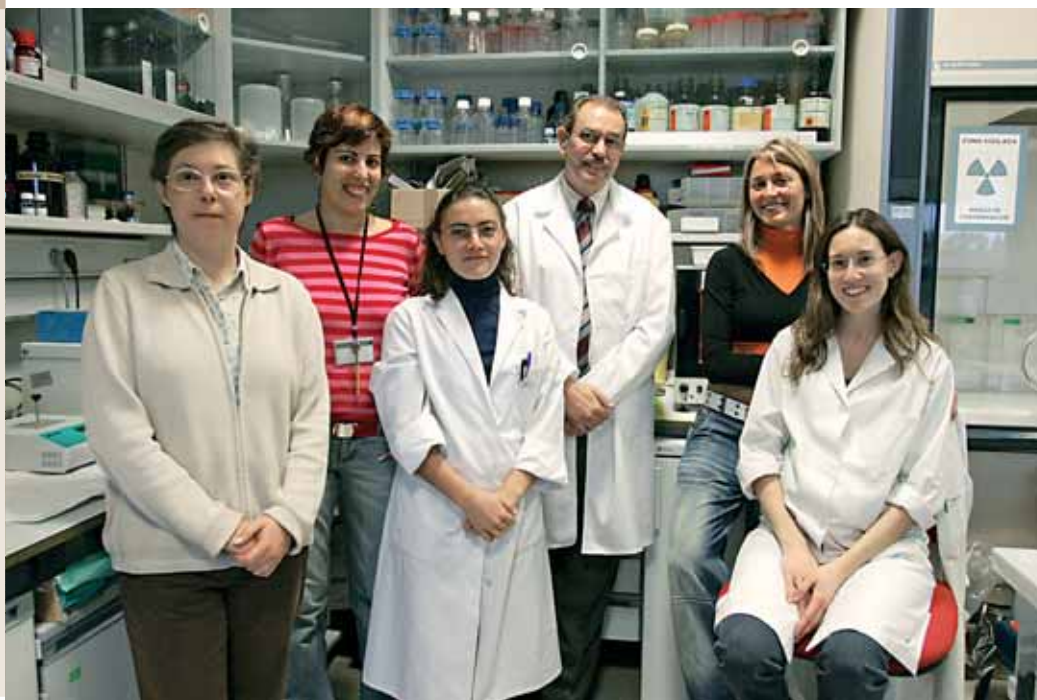
M.D. PhD., 1974.
Universidad Complutense de Madrid.
Facultad de Medicina, (1974-1975).
Hebrew University, Jerusalén, Israel.
Dept. of Biology, 1978.
Weizman Institute, Rehovot, Israel.
Dept. of Biology, 1983.
The John's Hopkins University, Baltimore, USA.
European Molecular Biology Laboratory, 1994.
Heidelberg, Germany.
Dept. of Pathology, 1997.
School of Medicine, NY University, USA.
Profesor de Investigación, 1991.
CIB, CSIC.

Investigadora del equipo | Staff Scientist:

María Colmenares

Otros Miembros | Other lab Members:

Ana M^a Alonso
M^a A. Abengoza
Pedro J. Alcolea
Abel Fernández
Saravana Kumar Mariyappan
Irene Ramos



Expresión Génica en
Infecciones por Microorganismos
Gene Expression of Infection by Microorganisms

Parasitología Molecular Molecular Parasitology

Se están determinando las bases moleculares de la respuesta inmune protectora frente a *L.infantum* inducida por la vacuna recombinante LACK en el perro y el papel de las células CD4⁺, CD8⁺ y presentadoras que están activadas en los órganos diana de los animales protegidos. Se ha obtenido una librería genómica del parásito y se están estudiando los genes relacionados con la infectividad en las distintas fases del mismo mediante análisis por "micro arrays".

The molecular basis of the protective immune response induced in the dog as a model against *L.infantum* infection by the recombinant LACK vaccine is being studied, as is the role of the CD4⁺, CD8⁺ and dendritic cells activated in the target organs of the protected animals. A genomic library has been constructed and the genes related with the infectivity of the parasite being determined by shot-gun microarray analysis.

La leishmaniasis es una enfermedad endémica que afecta a 15 millones de personas, con 2 millones de nuevos casos al año en países de zonas tropicales y templadas (el 88% de ellos en vías de desarrollo) y 50.000 muertes al año. Es endémica en la cuenca mediterránea y en Europa ha tenido un incremento importante en los últimos años, fundamentalmente en personas inmunodeprimidas, ya sea por tratamientos por trasplantes o por infección por el virus VIH. En España, el principal reservorio es el perro, con unos porcentajes medios de infestación del 10 por ciento, pero hay zonas con una incidencia muy elevada (hasta el 34%). La mayor parte de los estudios sobre la respuesta del sistema inmune frente a la infección por *Leishmania* se han llevado a cabo en modelos murinos. En el perro, hemos determinado que la respuesta inmune protectora es de tipo celular, en la cual el desequilibrio del balance Th1/Th2 aparece como indicador de la evolución de la infección hacia la curación o la enfermedad. Se ha analizado la producción de citoquinas (IL-4, IL-10, IFN γ , IL-12). La infección induce una proliferación de los tipos Th1 y Th2 que se decanta por las Th1 en los animales vacunados y protegidos. El papel de los receptores DC-SIGN en la infección de las células presentadoras por el parásito también se ha estudiado. Se ha obtenido una genoteca completa de *L.infantum* y se está determinando la expresión génica relacionada con la infectividad del parásito mediante análisis por "microarrays". Un análisis similar se está iniciando en las células activadas del ganglio linfático de los perros protegidos por la vacuna.

Leishmaniasis is a disease produced by protozoa of the genus *Leishmania* that affects 15 million people worldwide, and which produces 2 million new cases and 50,000 deaths each year. This disease is endemic to the Mediterranean basin and in recent years, an increase has been detected in the immunodepressed European population. The main reservoir in Spain is in dogs, with 10% of the animals infected in the zones of highest incidence, although most immune studies have been carried out in the mouse model. In the dog, we have defined a cell protective immune response that plays a key role in the Th1/Th2 balance responsible for protection or the progression of the disease. Cytokine production (IL-4, IL-10, IFN γ , IL-12) in sick and vaccinated (LACK) animals showed that after an initial increase of both Th1 and Th2 subpopulations, it is the Th1 pathway that is dominant in the vaccinated and protected animals. The role of the DC-SIGN receptors on macrophages/dendritic cells in parasite infection is also being studied. A genomic library of *L.infantum*, the species responsible for the disease in Europe, has been obtained and differential gene expression related to parasite infectivity is being assessed by microarray analysis. In addition, gene expression of lymph node activated cells is also being studied in protected animals.

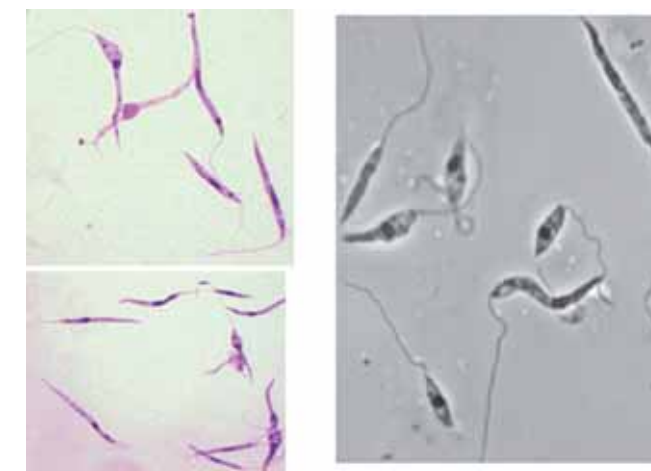


Fig. 1. Promastigote del protozoo *Leishmania*.
Promastigote of the *Leishmania* protozoa.



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J.M., Peris, A., Castillo, J.A., Colmenares, M., and Larraga, V. (2008). Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. **Vaccine** 17, 26(3), 333-434.

Whitaker, S.M., Colmenares, M., Pestana, K.G., and McMahon-Pratt, D. (2008). *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. **Infect. Immun.** 76(5), 2149-2156.

Dominguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Martín-Gayo, E., Martínez-Prats, L., Colmenares, M., Naranjo-Gómez, M., Borrás, F.E., Muñoz, P., Zubiaur, M., Toribio, M.L., Delgado, R., and Corbí, A.L. (2007). The DC-SIGN-related lectin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. **Blood** 15, 109(12), 5337-5345.

Oliveira Gómez, D.C., Fonseca Pinto, E.; Barbosa de Melo, L.D., Pacienza Lima, W., Larraga, V., and Rossi-Bergman, B. (2007). Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral *Leishmania* in mice. **Vaccine** 25, 2168-2172.

Ver más en: www.cib.csic.es/es



Sara Isabel Pérez Prieto
Investigadora Titular de OPI
saraip@cib.csic.es

Ph.D. en C.C. Biológicas, 1978.
Universidad Complutense de Madrid.
Contratada CSIC, (1978-1980).
Inst. Jaime Ferrán de Microbiología.
Titulada Superior Especializada, (1981-2002).
Inst. Jaime Ferrán de Microbiología y CIB.
Jefa de Grupo, 1995.
CIB, CSIC.
Investigadora Titular de Organismo Público de
Investigación, 2002.
CIB, CSIC.



Sylvia Rodríguez Saint-Jean
Investigadora Titular de OPI
sylvia@cib.csic.es

Doctora Veterinaria, 1994.
Universidad Complutense de Madrid.
Titulada Superior Especializada, (1982-2002).
Inst. Jaime Ferrán de Microbiología y CIB.
Investigadora Titular de Organismo Público de
Investigación, 2002.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Luis Guaita Benet
Ana Isabel de las Heras
Mercedes Sánchez Carmona

Expresión Génica en
Infecciones por Microorganismos
Gene Expression of Infection by Microorganisms

Virología en Acuicultura Viruses in Reared Fish

Los virus de salmónidos como el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) inducen enfermedad aguda con altas mortalidades seguidos de infecciones crónicas (portadores asintomáticos) cuyos mecanismos de establecimiento han sido escasamente investigados. Nuestro grupo estudia factores moduladores de virulencia y del estado de portador relacionados con las características del virus, estados antivíricos celulares inducidos por IFNs y la respuesta a sobre-infecciones con virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV).

Salmonid fish viruses, such as the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), can cause acute disease and high mortality, as well as chronic infection in survivors. Our research team focuses mainly on studying several factors that modulate the virulence, the carrier state and the connection with the antiviral states induced by IFN and related genes. In addition, we are interested in the hosts' immune responses to viral super-infection with infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV).

En trabajos previos hemos estudiado la capacidad de algunos virus de salmónidos para inducir protección frente a virus homólogos y heterólogos en infecciones simples o en coinfecciones y que esta protección está relacionada con la expresión de la proteína Mx inducida por IFN. La activación del sistema inmune innato explica la interferencia y pérdida de infectividad del virus IHN en presencia del virus IPNV. Y hemos demostrado que en coinfecciones la interferencia IPNV-IHNV se produce desde las primeras fases del ciclo infeccioso. Nuestro grupo ha desarrollado una vacuna DNA para determinar el papel del gen VP2 del IPNV en la respuesta inmune innata y adquirida y su relación con la pérdida de virulencia del IHNV en coinfecciones. Hemos demostrado que la expresión del gen VP2 de IPNV también induce estados antivíricos *in vitro* e *in vivo* y anticuerpos neutralizantes, por lo que es buen candidato para el diseño de vacunas DNA. También se está colaborando en un estudio genómico comparativo de virus chilenos y españoles de poblaciones de trucha y salmón.

Nuestras principales áreas de interés actuales y futuras son: 1) Determinar y cuantificar los perfiles de expresión de interferones y otros genes inducidos por IPNV y por vacunas DNA; 2) Estudiar la persistencia viral en peces vacunados con subunidades víricas o con vacunas recombinantes comerciales; 3) analizar determinadas caseínas y sus hidrolizados enzimáticos como nuevos antivíricos de origen alimentario para reducir la infección o suprimir el estado de portador y 4) Estudiar la inhibición del IPNV en cultivos celulares y *in vivo*, mediante RNA interferente.

We previously studied the ability of some salmonid fish viruses to induce protection against homologous and heterologous viruses in single or double infections, and accordingly, protection appeared to be related to the Mx expression induced by IFN. The activation of the innate immune system partly explains the interference and loss of infectivity of IHNV when IPNV is present. Indeed, we demonstrated that IPNV-IHNV interference is induced from the very first steps of the infective cycle. The group has also developed a DNA vaccine to investigate the role of the IPNV-VP2 gene in innate and specific immune responses, and the connections with the loss of IHNV virulence in co-infection. We demonstrated that IPNV-VP2 gene expression also induces an antiviral state *in vitro*, as well as the production of neutralizing antibodies *in vivo*.

Thus, it is a good candidate on which to base DNA vaccines that can probably be improved by using cytokines as co-stimulating molecules. Within these areas, we also collaborate on a comparative genome study of Chilean and Spanish virus isolates from brown trout and salmon populations.

Our main current and future research interests are: 1) To determine and quantify the expression of interferons and other genes induced by IPNV and by IPNV-DNA vaccines; 2) To study viral persistence in fish vaccinated with viral subunits or with a recombinant commercial vaccine; 3) To analyse a number of casein fractions and their enzymatic hydrolysates as new antivirals that could reduce infection or suppress the carrier state; and finally, 4) To study the inhibition of IPNV replication by small interfering RNAs in cell culture and *in vivo*.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

de las Heras, A., Pérez Prieto, S.I., and Rodríguez Saint-Jean, S. (2009). *In vitro* and *in vivo* immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunol.** (in press).

de las Heras, A., Rodríguez Saint-Jean, S., and Pérez-Prieto, S.I. (2008). Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. **J Fish Diseases** 31: 535-546.

Rodríguez Saint-Jean, S., and Pérez Prieto, S.I. (2007). Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. **Fish & Shellfish Immunol.** 23, 390-400.

Rodríguez Saint-Jean S., and Pérez-Prieto, S.I. (2006) Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. **Vet Immunol. Immunopath.** 110, 1-10.

Tafalla, C., Rodríguez Saint-Jean, S., and Pérez-Prieto, S.I. (2006). Immunological consequences of the coinfection of brown trout (*Salmo trutta*) with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). **Aquaculture** 256, 15-22.

Ver más en: www.cib.csic.es/grupo.php?idgrupo=51



Ernesto García López
 Profesor de Investigación
 e.garcia@cib.csic.es

Ph.D., 1974.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral,
 Centre d'Étude de l'Énergie Nucléaire, Mol (Bélgica).
 Científico Titular, 1979, Investigador Científico, 1986 y
 Profesor de Investigación, 1990.
 CIB, CSIC.



Pedro García González
 Investigador Científico
 p.garcia@cib.csic.es

Ph.D., 1982.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral,
 Centre National de la Recherche Scientifique, Université
 Paul Sabatier, Toulouse (Francia).
 Científico Titular, 1986 e Investigador Científico, 2002.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

- Eloísa Cano Congosto
- Miriam Moscoso Naya
- Susana Campuzano Ruiz
- José Yuste Lobo
- Ana González Moreno
- María Morales Areizaga
- Miriam Domenech Lucas
- Elisa Ramos Sevillano
- María del Mar Esteban Torres
- Marta Rojo Moreno

**Interacciones Huésped-Parásito
 en Infecciones Neumocócicas
 Host Parasite Interplay in Pneumococcal Infection**

**Genética Bacteriana
 Bacterial Genetics**

***Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es, entre los agentes infecciosos, el máximo responsable de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Además, algunas cepas de esta bacteria presentan una gran resistencia a muchos antibióticos. Nuestro laboratorio se centra en el estudio de diversos factores de virulencia y en la búsqueda de nuevas moléculas antibacterianas para tratar de combatir la enfermedad neumocócica.**

Among the infectious agents, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is one of the major causes of morbidity and mortality throughout the world. In addition, some strains of this bacterium also show increasing resistance against many antibiotics. Our laboratory focuses on the study of several virulence factors and on the search of new antibacterial molecules to fight pneumococcal disease.

La colonización del tracto respiratorio superior por neumococo, así como el desarrollo posterior de la enfermedad (neumonía, sepsis y meningitis, entre otras manifestaciones) tienen lugar mediante el establecimiento de complejas interrelaciones entre la bacteria patógena y el huésped humano. Buena parte de ellas se establecen entre proteínas de superficie de la bacteria y receptores específicos localizados en la célula eucariótica, así como entre aquellas y diversos componentes de la respuesta inmune. En nuestro laboratorio se estudian los genes responsables de la formación de biofilms y la composición de la matriz de los mismos, imprescindible para la integridad estructural del biofilm y el establecimiento de la colonización nasofaríngea. Asimismo, se analizan las interacciones de las mureín-hidrolasas de la pared celular de *S. pneumoniae* con diversos receptores celulares y el papel de tales hidrolasas tanto en la virulencia de la bacteria como en la evasión del sistema inmune. Para ello se utilizan mutantes en diversas hidrolasas de pared y se estudian en diversos sistemas modelo (biofilms, cultivos celulares y ensayos de opsonización y fagocitosis) así como modelos animales de colonización, neumonía, sepsis y meningitis. Las mureín-hidrolasas, tanto de *S. pneumoniae* como de los fagos que le infectan, son proteínas de unión a colina, componente de la pared bacteriana, que se estudian desde el punto de vista de su estructura y su función fisiológica. También se está ensayando el potencial terapéutico de diversas enzimas líticas de pared, dependientes o no de colina, en biofilms así como en modelos animales de infección.

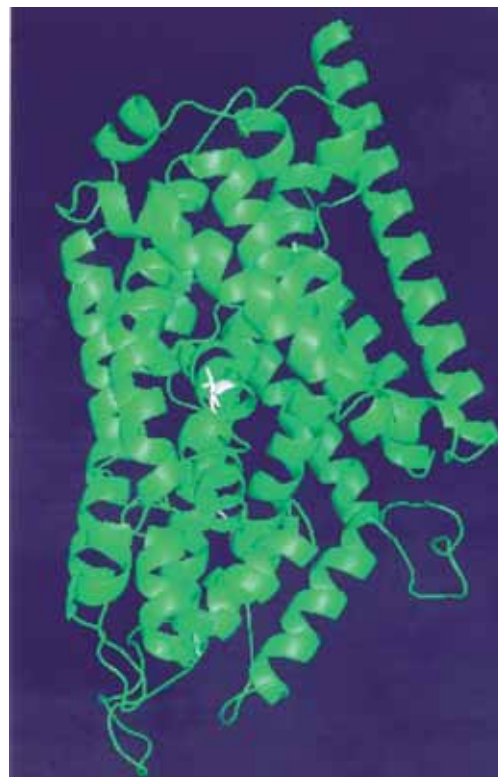


Fig. 1. Modelo tridimensional de TacF, transportador transmembranal de la unidad repetitiva del ácido teicoico de la pared celular de neumococo.
 Three-dimensional model of TacF, a teichoic acid repeat unit transmembrane transporter from pneumococcus.

The colonization of the upper respiratory tract by pneumococcus and the eventual development of diseases such as pneumonia, sepsis and/or meningitis, take place through the establishment of a complex interplay between the pathogen and the human host. Most of these interactions involve bacterial surface proteins on the one hand, and cellular receptors and host defence mechanisms on the other. In our laboratory, we study the genes responsible for biofilm formation and the biochemical composition of the intercellular matrix that is much needed for the structural integrity of biofilm and for the onset of nasopharyngeal colonization. Moreover, we also examine the interactions between the pneumococcal cell wall hydrolases and cellular receptors, as well as the role of those hydrolases in immunity evasion. For all these approaches, we use *S. pneumoniae* mutants deficient in one or more cell wall hydrolase in several model systems (e.g., biofilms, cell cultures and opsonophagocytic assays), as well as in animal models of infection (colonization, pneumonia, sepsis and meningitis). Murein hydrolases are choline binding proteins that are encoded by *S. pneumoniae* and its phages. Choline is a key aminoalcohol of the bacterial cell wall and choline binding proteins are being studied both from the structural and physiological viewpoints. Moreover, the therapeutic potential of some cell wall hydrolases, either from the bacterium or from its phages, is being tested in biofilms and animal models of pneumococcal infection.

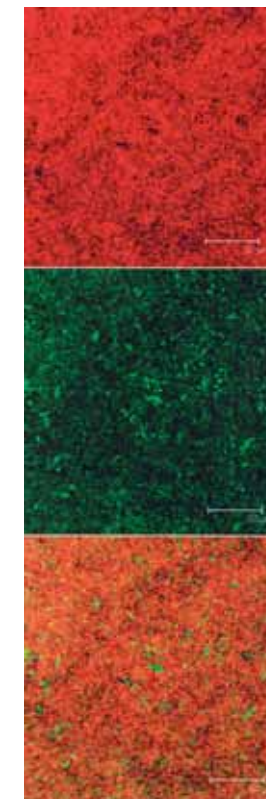


Fig. 2. Presencia de polisacárido en la matriz intercelular de un biofilm de neumococo. Microfotografía láser confocal teñida con Syto59 (fluorescencia roja) o con la lectina WGA conjugada con Alexa488 (fluorescencia verde). En la parte inferior, se muestra la superposición de ambas imágenes.
 The intercellular matrix of a pneumococcal biofilm contains a polysaccharide. Confocal laser micrograph stained with Syto59 (red) or with Alexa488-conjugate WGA lectin (green). A combined figure is shown at the bottom.



**Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications**

- González, A., Llull, D., Morales, M., García, P., and García, E. (2008). Mutations in the *tacF* gene of clinical strains and laboratory transformants of *Streptococcus pneumoniae*: impact on choline auxotrophy and growth rate. **J. Bacteriol.** 190, 4129-4138.
- Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. **Curr. Opin. Microbiol.** 10, 461-472.
- Maestro, B., González, A., García, P., and Sanz, J.M. (2007). Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. **FEBS J.** 274, 364-376.
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., del Prado, G., Gracia, M., Ponte, C., López, R., and Soriano, F. (2007). Pneumococcal LytA autolysin: a potent therapeutic agent in experimental peritonitis-sepsis caused by highly β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51, 3371-3373.
- Romero, P., López, R., and García, E. (2007). Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Biol. Chem.** 282, 17729-17737.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=7



José Luis Rodríguez-Fernández
Científico Titular
rodrifer@cib.csic.es

MSc 1989 y PhD 1993, en Biología.
The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.
Postdoctoral, (1994-1997).
Imperial Cancer Research Fund, Londres, Gran Bretaña.
Contratado MEC, (1997-2001).
Universidad Complutense de Madrid.
Contratado FIS, (2001-2003).
Hospital Gregorio Marañón, Madrid.
Contratado Ramón y Cajal, (2003-2006).
CIB, CSIC, Madrid.
Científico Titular, 2006.
CIB, CSIC, Madrid.

Otros Miembros | Other lab Members:

Cristina Delgado Martín
Cristina Escribano Díaz
Felicia Patti



Rodríguez-Fernández, J.L. (2008).
Chemoattraction and cancer. In: *Encyclopedia of Cancer*. M. Schwab (Ed.) Springer. Alemania.

Rodríguez-Fernández, J.L., and Riol-Blanco, L. (2007).
Chemoattraction: basic concepts and role in the Immune Response. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Inc. Gran Bretaña.

Sánchez-Sánchez, N., Riol-Blanco, L., Rodríguez-Fernández, J.L. (2006). The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J. Immunol.* 176, 5153-5159.

Riol-Blanco, L., Sánchez-Sánchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbí, A.L., Sánchez-Mateos, P., and Rodríguez-Fernández, J.L. (2005). The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signalling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J. Immunol.* 174, 4070-4080.

Rodríguez-Fernández, J.L., and Corbí, A.L. (2005). Adhesion molecules in human dendritic cells. *Curr Opin Invest Drugs* 6, 1103-1111.

Ver más en:
www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=60

Funciones y Mecanismos Moleculares Reguladores de las Funciones de los Receptores Quimiotácticos
Functions and Molecular Mechanisms Regulating the Functions of Chemokine Receptors

Las células dendríticas (CDs) desempeñan un papel fundamental durante la respuesta inmune. Los receptores quimiotácticos, aparte de la quimiotaxis, pueden regular en diferentes tipos celulares la citoarquitectura, la supervivencia, la adhesión celular, la velocidad migratoria, la endocitosis o la diferenciación. Nuestro grupo está interesado en analizar los mecanismos moleculares mediante los cuales los receptores de quimioquinas pueden modular las funciones de las CDs. Las CDs expresan los receptores de quimioquinas CCR7 (ligandos CCL19 y CCL21) y CXCR4 (ligando CXCL12). En nuestro grupo analizamos los mecanismos moleculares mediante los cuales CCR7 y CXCR4 regulan diferentes funciones de las CDs. Finalmente, también analizamos el papel que el receptor CCR7 juega en el melanoma, un tipo de célula metastática muy agresiva.

Dendritic cells (DCs) play a key role during the immune response. Apart from chemotaxis, chemotactic receptors may also control additional functions in different cell types, including their cytoarchitecture, survival, cell adhesion, migratory speed, endocytosis or differentiation. Our group is interested in studying the molecular mechanisms whereby chemokine receptors can control DC function. Since DCs express the CCR7 (ligands CCL19 and CCL21) and CXCR4 (ligand CXCL12) chemokine receptors, we are analysing the molecular mechanisms whereby CCR7 and CXCR4 regulate DC activities. We are also analysing the role of the CCR7 receptor in melanoma, a very aggressive metastatic cell.

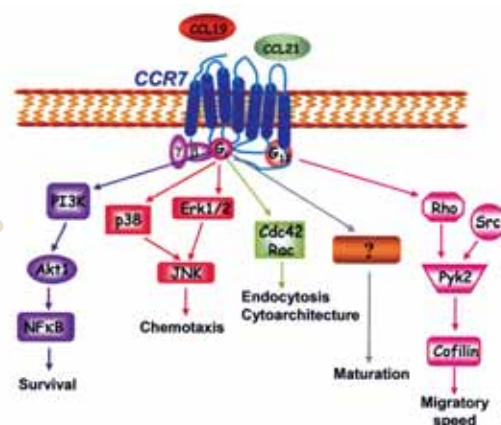


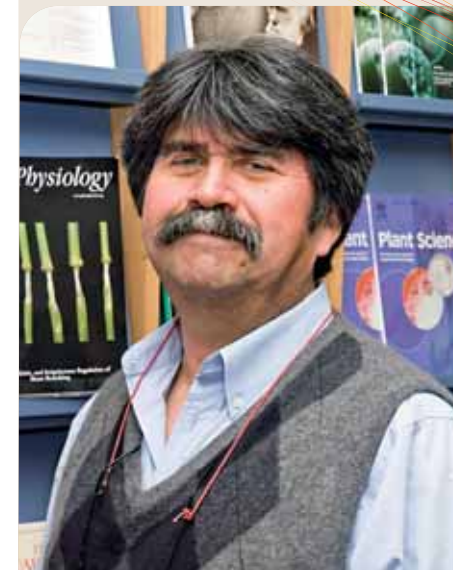
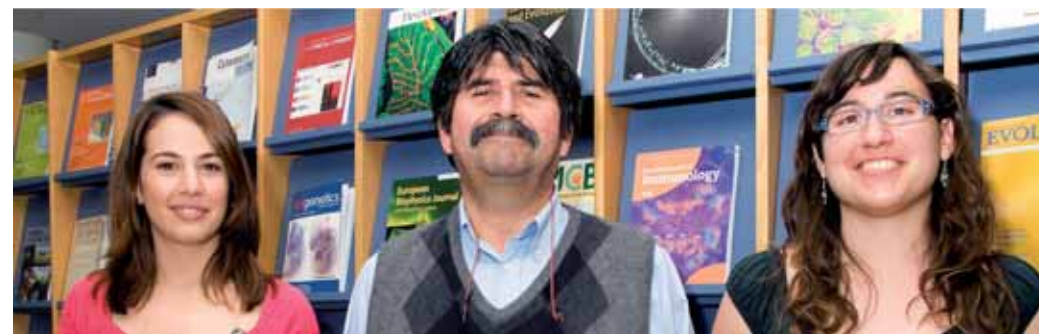
Fig. 1. Algunos componentes señalizadores que regulan las funciones de CCR7 en las células dendríticas.
Some signalling components regulating the functions of CCR7 in dendritic cells.



Células Inmunes Innatas en la Inflamación y en la Interacción Patógeno-Hospedador
Innate Immune Cells in Inflammation and Host-Pathogen Interaction

Biología Molecular de Hongos Basidiomicetos
Molecular Biology of Basidiomycete Fungi

Las conclusiones de los estudios más recientes de una población de monocariotes de *Pleurotus ostreatus* indican que si las actividades enzimáticas son mapeadas como rasgos cuantitativos en lugar de mapear los genes estructurales, la región del genoma que contienen los reguladores de estas actividades serán detectadas además de los genes estructurales. Nosotros hemos utilizado esta aproximación para las actividades de lacasa (Pox) y MnP/VP (Figura) y hemos identificado varias regiones genómicas que controlan estas actividades y ese mapa para enlazar los diferentes grupos desde aquellos donde han sido previamente mapeados los correspondientes genes estructurales. Estos nuevos sitios podrían codificar para genes reguladores. Además, colaboramos con el CIEMAT y el CBMSO en el estudio de microorganismos del aire interior. Con la empresa NEURONbp en el aislamiento de cepas de hongos bajo una fuerte presión ambiental para la producción de metabolitos secundarios y con el CIFOR-INIA en la degradación de la biomasa lignocelulósica mediante tratamientos combinados para producir etanol celulósico.



Aldo Gonzalez
Científico Titular
aldo@cib.csic.es

PhD Ciencias Biológicas, 1986
Universidad Autónoma de Madrid.
Coordinador Programa de investigación en educación, (1970-1973)
Ministerio de Educación, Santiago, Chile.
Guest Researcher, 1973
Karlsruhe Universität, RFA.
Científico Titular, (1984)
Vice-Director (1992-1994)
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

María Muñoz Vicente
Marta Sánchez Muñoz
José M^a Carbajo García
Kary Haro, Cristina M^a García
Yasmina Mata Contreras



Tania González, María Carmen Terrón, Susana Yagüe, Howard Junca, José María Carbajo, Ernesto Javier Zapico, Ricardo Silva, Ainhoa Arana-Cuenca, Alejandro Téllez, Aldo Enrique González (2008) Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Res Microbiol* 159: 103-109.

Eugenio Martín, María; Jose María Carbajo; María del Carmen Terrón; Aldo E González; Juan Carlos Villar (2008) Bioremediation of Lignosulphonates by lignin-degrading basidiomycetous fungi. *Biores Technol* 99:4929-4934.

Santoyo, Francisco, González, Aldo E., Terrón, María C., Ramírez, Lucía and Pisabarro, Antonio G. (2008) Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enz Microb Technol* 43:137-143.

Ver más en:
www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=10

Las conclusiones de los estudios más recientes llevados a cabo en una población de *Pleurotus ostreatus* monokaryons, indicaron que si las actividades enzimáticas se mapeaban como rasgos cuantitativos en lugar de mapear los genes estructurales, las regiones del genoma que contienen reguladores de estas actividades serán detectadas además de los genes estructurales. Hemos utilizado este enfoque para las actividades de lacasa (Pox) y MnP/VP (Figura) y hemos identificado varias regiones genómicas que controlan estas actividades y ese mapa para enlazar los diferentes grupos desde aquellos donde han sido previamente mapeados los correspondientes genes estructurales. Estos nuevos sitios podrían codificar para genes reguladores.

Además, colaboramos con CIEMAT y CBM-CSIC para estudiar microorganismos del aire interior; con la empresa NEURONbp en el aislamiento de cepas de hongos bajo condiciones ambientales desfavorables para producir metabolitos secundarios, y con CIFOR-INIA en la degradación de biomasa lignocelulósica mediante tratamientos combinados para producir etanol celulósico.

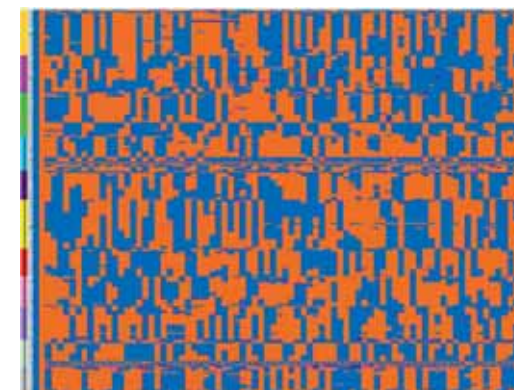
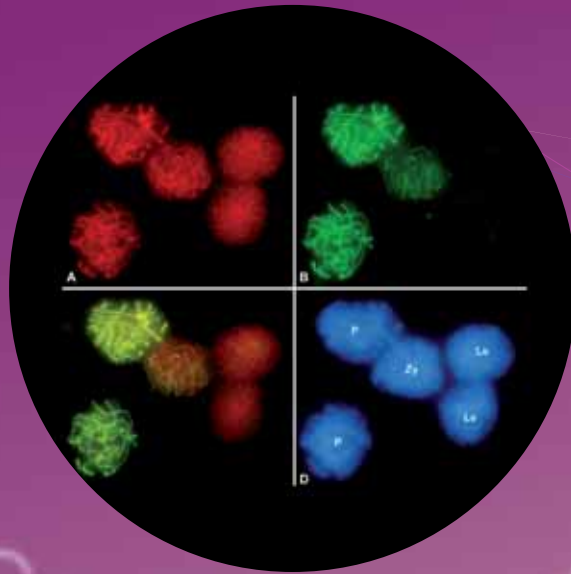


Fig. 1. Mapa de ligamiento de las enzimas Pox y MnP en *Pleurotus ostreatus*.
Genotype of the mapping population of *P. ostreatus*.

CIB



ÍNDICE

Dinámica Cromosómica Chromosome Dynamics

José Luis Barbero	122
Clara Goday	124
Susana Moreno Díaz de la Espina	126
J. Bernardo Schwartzman Pablo Hernández, Dora B. Krimer	128

Regulación Genética y Epigenética de la Identidad Celular Genetic and Epigenetic Regulation of Cell Identity

Pedro Esponda y Juan F. Giménez-Abián	130
Jesús del Mazo	132
Lucas Sánchez	134
Miguel A. Vidal	136

Overview

Cell Proliferation and Development

The cell is the basic unit of life and to further our biological knowledge, it is fundamental to understand the structure and function relationships of cells.

The CELL PROLIFERATION AND DEVELOPMENT programme brings together a group of independent and highly interactive laboratories whose aim is to understand important processes in cell replication and diversification. Cell proliferation is an attribute of all life forms that is closely linked to processes of growth and division, and in multicellular organisms it is also linked to the appearance of specialized cell types. A multiplicity of mechanisms have been selected during evolution to regulate cell proliferation and to ensure that cell diversity is generated during the embryonic and adult phases of organisms life cycle. Alterations to these regulatory networks are a hallmark of major human disorders. The research topics addressed by the different groups in this

programme are organised into two areas, "Chromosome dynamics" and "Genetic and epigenetic regulation of cell identity", which take advantage of a variety of model organisms (e.g., mammals, flies, plants, yeast, bacteria). A unifying feature that brings strength and coherence to this programme is our conviction that the answers to these fundamental curiosity-driven questions in basic cell and molecular biology lie at the heart of the potential applications that may arise from the knowledge obtained. However, while our pursuit is stimulated and guided by the goal of understanding basic processes, we are aware that our discoveries may lead to more technical applications, a feature that makes us unique and distinguishes this programme from other research lines at the CIB.

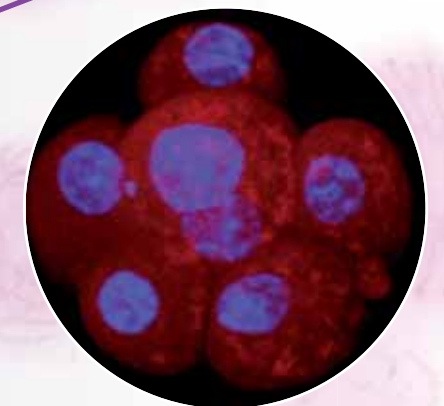
Proliferación Celular y Desarrollo

La célula es la unidad básica de la vida y una comprensión cabal de la biología requiere conocer a fondo la estructura y función de las células.

El programa PROLIFERACIÓN CELULAR Y DESARROLLO lo conforman un grupo de laboratorios independientes que colaboran estrechamente con el objetivo de avanzar en el conocimiento de procesos básicos como la replicación y diversificación celular. La proliferación celular es un atributo de todas las formas de vida íntimamente asociado con los procesos de crecimiento y división, y en los organismos multicelulares también ligado al desarrollo de tipos celulares especializados. Un gran número de mecanismos reguladores han sido evolutivamente seleccionados para asegurar la proliferación celular y la diversificación de distintos tipos celulares durante la embriogénesis y distintas fases de la vida adulta. La alteración de algunas de estas redes de regulación caracterizan importantes

enfermedades humanas. Los problemas abordados por los laboratorios de este programa se agrupan en dos sub-programas: "Dinámica de los cromosomas" y "Regulación genética y epigenética de la identidad celular". Para ello se utilizan una gran variedad de sistemas modelo, como mamíferos, insectos, plantas, levaduras, bacterias, etc. Un elemento que unifica y da fuerza y coherencia a este programa es la convicción de que en las respuestas a estas preguntas fundamentales, cuyo objetivo es avanzar en el conocimiento en biología celular y molecular, están las bases de las posibles aplicaciones que se pueden derivar de este conocimiento. No obstante, aunque el objetivo primario es la comprensión de procesos biológicos básicos, ello no implica renunciar al estudio de mecanismos que pueden tener aplicaciones prácticas. Esta característica de nuestro programa lo hace único y distinto de todos los demás programas desarrollados en el CIB.

Presentación





José Luis Barbero Esteban
Investigador Científico
jlbarbero@cib.csic.es

PhD, 1981.
Universidad Complutense de Madrid.
Associate Research, NYU Medical Center. Pathology Department, New York, USA, 1984.
Investigador, 1983-1996.
Farmacia/Antibióticos Pharma.
Group Leader, 1996-2006.
Farmacia/Dept. of Immunology and Oncology, CNB.
Investigador Científico, 2006.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Maria Fernanda Ruiz Lorenzo
Ana Cuadrado García

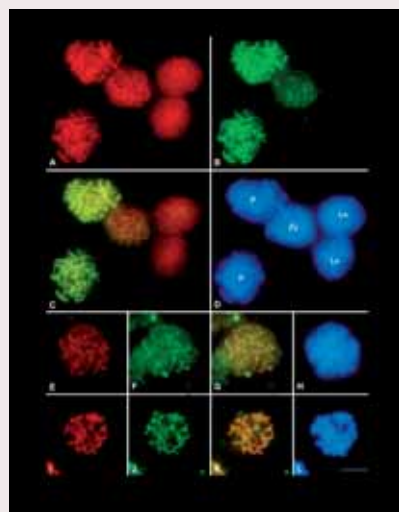


Fig. 1. Cohesinas en saltamontes. Localización de cohesinas en profase I de espermatocitos de saltamontes.
Grasshopper cohesins: localization of cohesin in prophase I grasshopper spermatocytes.

Dinámica Cromosómica en Meiosis Chromosomal Dynamics in Meiosis

Durante la división celular, es esencial que el material genético sea correctamente repartido a las células hijas ya que los errores en los mecanismos que controlan dicho proceso conducen a la muerte de la célula o a la aparición de patologías como el síndrome de Down, la formación de tumores o la infertilidad. En la segregación cromosómica, la regulación espacio-temporal de la cohesión y separación de las cromátidas hermanas es llevada a cabo esencialmente por el complejo de cohesinas en mitosis y meiosis.

During somatic and germ cell division, the chromosomes must be correctly distributed between the daughter cells and errors in this essential process lead to cell death or pathological disorders such Down's syndrome, tumour formation and infertility. Thus, establishing, maintaining and reversing sister chromatid cohesion is one of the most fascinating and dangerous processes in the life of a cell. The so-called cohesin complexes and cohesin-regulators are essential in sister chromatid cohesion during both mitosis and meiosis.



Hace algún tiempo identificamos y caracterizamos la familia de proteínas denominadas STAG y utilizando anticuerpos generados contra dichas proteínas de diferentes fuentes (humanas, ratón e insecto) estudiamos su contribución como subunidades del complejo de cohesinas en segregación cromosómica. Posteriormente, resultados publicados en la literatura, esencialmente utilizando levadura como modelo, han identificado nuevas moléculas que regulan la asociación/disociación del complejo de cohesinas a la cromatina. Nuestra investigación en estos últimos dos años se ha centrado en el estudio de la función de tres proteínas reguladoras de cohesinas, PDS5 (de "precocious dissociation of sister"), Shugoshinas and Sororina (de "soror" hermanas en latín) durante el ciclo meiótico en mamíferos.

En colaboración con el grupo de JA Suja (Universidad Autónoma de Madrid) hemos mostrado que la shugoshina SGOL2, ortólogo de Sgo2 de *S. pombe*, actúa como protector de la cohesión centrómerica a lo largo de la meiosis I y que redistribuye su localización durante la meiosis II en dependencia de la tensión de los microtúbulos proponiendo un mecanismo por el que SGOL2 controla la cohesión en los centrómeros en meiosis de mamíferos. Además hemos analizado la función de SGOL2 in vivo determinando su papel esencial en meiosis en ratones deficientes en SGOL2, modelo generado en el laboratorio de AM Pendás (colaboración con los grupos de JA Suja y AM Pendás). En este último año se ha demostrado que el complejo de cohesinas es algo más que el "pegamento de los cromosomas" y que desempeña funciones importantes en el control de la expresión génica y en desarrollo. Por ello, el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la interacción de las cohesinas con la cromatina nos permitirá conocer mejor procesos vitales en la vida de la célula.

We previously isolated and characterized the STAG family of very conserved proteins that are subunits of the cohesin complexes. Using antibodies generated against STAG proteins from different organisms (fly, mouse and man), we studied the contribution of distinct cohesin complexes to arm and centromeric sister chromatid cohesion in different insect and mammalian models. Other data, essentially from yeast, showed that cohesin association with and their dissociation from chromosomes was regulated by cohesin-interacting proteins denominated cohesin regulators. We are currently studying the function of three important cohesin regulators, PDS5 (from precocious dissociation of sister), Shugoshins and Sororin (from "soror", sister in latin), in the control of sister chromatid cohesion in the mammalian meiotic cell cycle. We recently reported (in collaboration with Dr. JA Suja) that the shugoshin SGOL2, the mammalian orthologue of yeast Sgo2, protects centromere cohesion throughout meiosis I and that during metaphase II, SGOL2 relocalizes in a tension-dependent manner in mouse spermatocytes. Hence, shugoshins also appear to be components of the tension-sensing machinery during mitosis and meiosis II. In addition, we characterized the function of SGOL2 in mammalian meiosis *in vivo* by studying the phenotype of the SGOL2 deficient mice generated by AM Pendás (in collaboration with JA Suja and AM Pendás). The last two years have seen an increase in the evidence that cohesins fulfil important functions in non-dividing cells, revealing new, unexplored roles for these proteins in the control of gene expression, development and other essential cellular activities in mammals. Thus, elucidating the molecular mechanisms that control the interaction of cohesin with chromatin will improve our understanding of how the cohesin complex is controlled in different cellular processes.

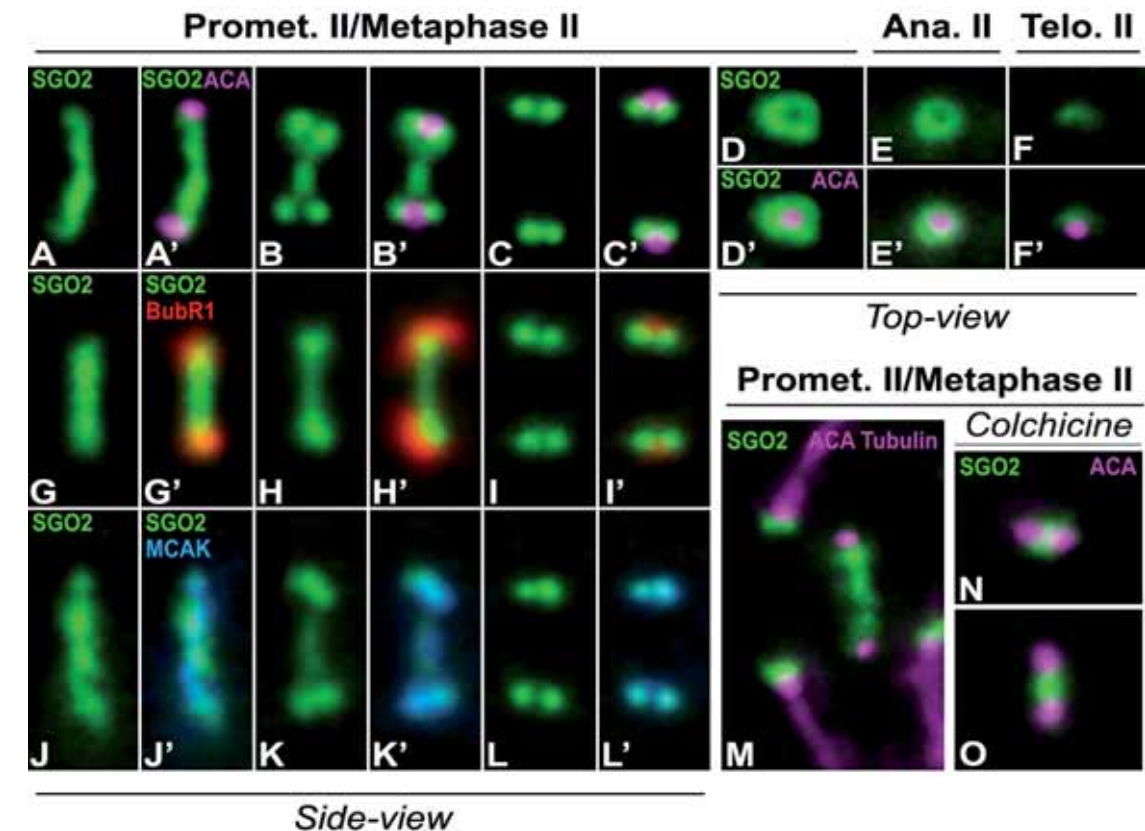


Fig. 2. Dinámica de SGOL2 en meiosis: Relocalización de la shugoshina SGOL2 dependiente de la tensión de los microtúbulos.
SGOL2 dynamics in meiosis: Redistribution of the mouse centromere cohesin protector shugoshin 2 depends on microtubule tension.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Suja, J.A., and Barbero, J.L. (2009). Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis In: **Genome Dynamics**, vol. 5, pp. 94-116, Benavente, R., and Volff, J.N. (ed). Karger, Basel.

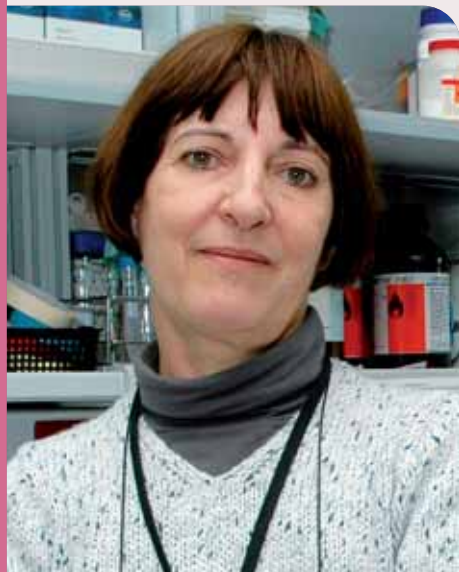
Llano, E., Gómez, R., Gutiérrez-Caballero, C., Herrán, Y., Sánchez-Martín, M., Vázquez-Quiñones, L., Hernández T., de Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J.L., Suja, J.A., and Pendás, A.M. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. **Genes Dev.** 22, 2400-2413.

Foster, R.E., Abdulrahman, M., Morris, M.R., Prigmore, E., Gribble, S., Beelin, Ng., Gentle, D., Ready, S., Weston, P.M., Wiesener, M.S., Kishida, T., Yao, M., Davison, V., Barbero, J.L., Chu, C., Carter, N.P., Latif, F., and Maher E.R. (2007). Characterization of a 3;6 translocation associated with renal cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 46, 311-317.

Gómez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M.T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J.S., Barbero, J.L., and Suja J.A. (2007). Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. **EMBO Rep.** 8, 173-180.

Valdeolmillos, A.M., Viera, A., Page, J., Prieto, I., Santos, J.L., Parra, M.T., Heck, M.M., Martínez-A, C., Barbero, J.L., Suja, J.A., and Rufas, J.S. (2007). Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. **PLoS Genet.** 3, 204-215.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=64

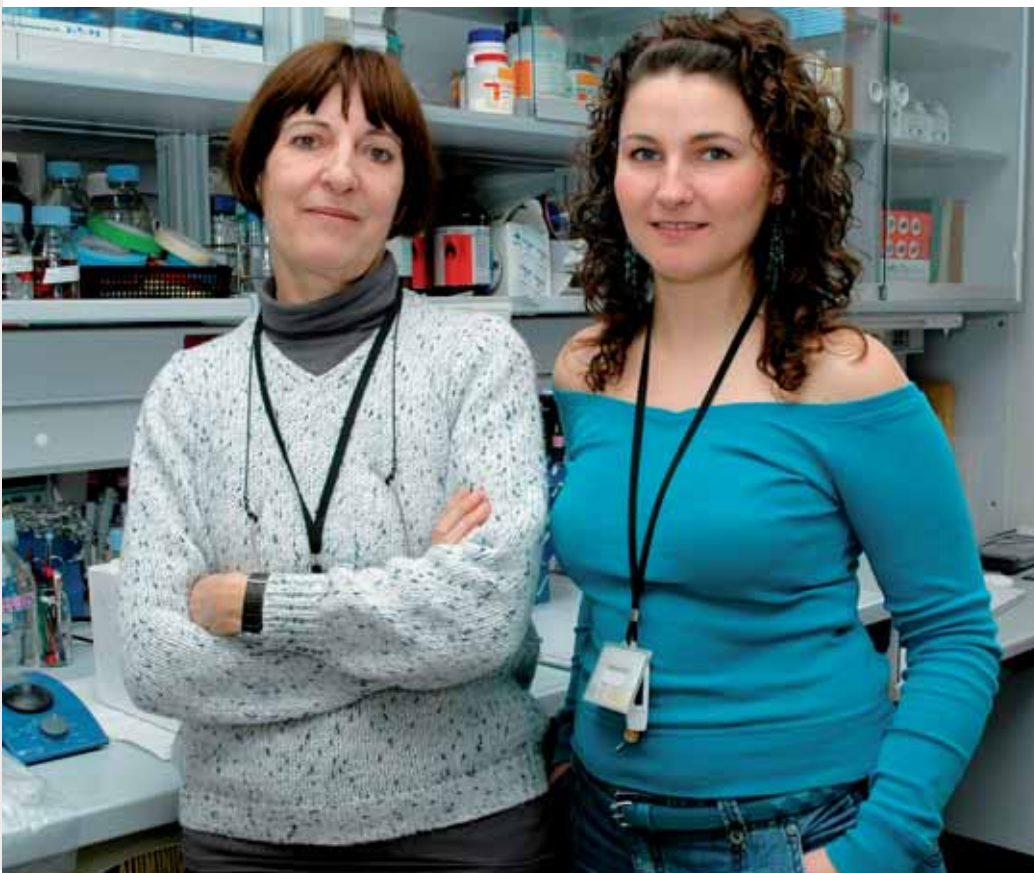


Clara Goday Baylina
Investigadora Científica
claragoday@cib.csic.es

PhD, 1980.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral.
Universidad de Roma, Italia.
Científica Titular, 1986.
CIB, CSIC.
Investigadora Científica, 2008.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

María del Carmen Escribá Pérez
Patricia González Greciano



Eliminación de Cromosomas en Insectos Chromosome Elimination in Insects

El díptero *Sciara* constituye un ejemplo clásico de eliminación programada de cromosomas y de impronta genómica, ya que durante el desarrollo cromosomas de origen paterno son selectivamente eliminados del genoma. En el sistema *Sciara*, es posible investigar modificaciones epigenéticas de la cromatina y del DNA implicadas en la regulación de alteraciones en la segregación cromosómica durante los procesos de eliminación.

A classic example of programmed chromosome elimination and genomic imprinting is found in sciarid flies (Diptera, Sciaridae), where chromosomes of paternal origin are selectively discarded from the genome during development. In *Sciara*, it is possible to investigate the epigenetic modifications to chromatin and DNA involved in regulating and the alterations in chromosome segregation that take place during chromosome elimination.

Modificaciones epigenéticas de la cromatina y eliminación de cromosomas en *Sciara*. Investigamos las modificaciones de la cromatina relacionadas con el origen parental de los cromosomas y con su eliminación durante el desarrollo de *Sciara*. Los cromosomas germinales de *S. ocellaris* y *S. coprophila* presentan acetilación/metilación de las histonas H3/H4 diferencial según el origen parental de los mismos. Las modificaciones de las histonas H3/H4 contribuyen a especificar el comportamiento, sometido a impronta, de los cromosomas durante su eliminación en la línea germinal. Estamos caracterizando las modificaciones

covalentes de las histonas y metilación del DNA durante los estadios embrionales tempranos en los que los cromosomas X paternos y los cromosomas L germinales son excluidos de las células presomáticas.

Caracterización citológica y molecular de la heterocromatina en *Sciara*.

1. Se han caracterizado en *S. coprophila* dos nuevas proteínas conteniendo cromodominios capaces de reconocer a la histona H3K9 metilada. Se generaron anticuerpos demostrándose que en los cromosomas germinales, ambas proteínas se asocian a las regiones heterocromáticas de los cromosomas ricos en H3K9 metilada y en DNA metilado. Colaboración con MR Ruiz, CIB y L Kremer, CNB.
2. Se ha iniciado la caracterización molecular de las regiones heterocromáticas del cromosoma X de *S. coprophila* que contienen el elemento regulador de su eliminación. Se ha microdisecionado la región heterocromática H2 y se ha llevado a cabo la extracción y amplificación del DNA. En colaboración con A Villasante (CBM) los clones secuenciados se están analizando y seleccionando según su localización en la heterocromatina del cromosoma X mediante hibridación *in situ*. Se ha llevado a cabo un análisis similar tras microdiseccionar cromosomas L de la línea germinal, los cuales contienen también copias del elemento CE.

Epigenetic chromatin modifications and chromosome elimination in *Sciara*.

We investigate the chromatin modifications related to the parental origin of chromosomes and to chromosome elimination during *Sciara* development. Acetylation/methylation of histones H3/H4 differentially mark germline chromosomes of *S. ocellaris* and *S. coprophila* depending on their parental origin. Histone H3/H4 modifications contribute to specifying the imprinted behaviour of chromosomes during chromosome elimination in germline cells. We are currently analyzing covalent histone modifications and DNA methylation during early embryonic cleavages, where paternal X-chromosomes and germline L-chromosomes are eliminated from presomatic cells.

Cytological and molecular characterization of heterochromatin in *Sciara*

1. We characterized two new heterochromatin proteins in *S. coprophila* that contain chromodomain motifs capable of recognizing methylated H3K9. We generated antibodies and demonstrated that both proteins associate to heterochromatic chromosomal regions enriched in methylated H3K9 and methylated DNA in somatic and germline *Sciara* chromosomes (in collaboration with MR Ruiz, CIB, and L Kremer, CNB).
2. A molecular characterization of *S. coprophila* X-chromosome heterochromatin containing the CE locus that regulates its elimination has been undertaken. We have microdissected the H2 heterochromatic region of the X-chromosome before extracting and amplifying the DNA. In collaboration with A Villasante (CBM), the sequenced clones are being analyzed molecularly and selected for their location in the heterochromatin by *in situ* hybridization of the X chromosome of *S. coprophila*. A similar analysis was carried out following microdissection of whole heterochromatic L chromosomes that also contain CE copies.



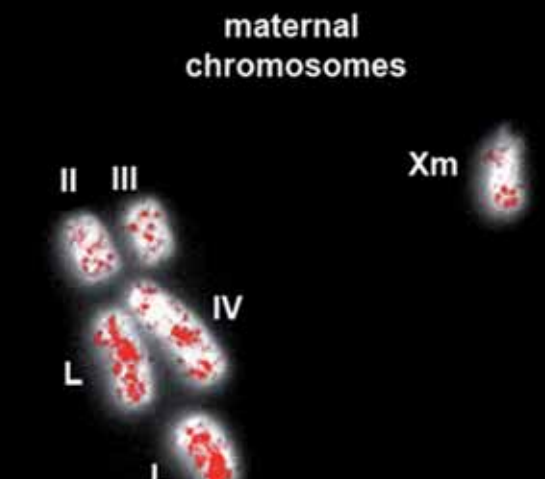
**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

Greciano, P.G., Ruiz, M.F., Kremer, L., and Goday, C. (2008). Two new chromodomain-containing proteins that associate with heterochromatin in *Sciara coprophila* chromosomes. **Chromosoma** 2009 Feb 10. [Epub ahead of print] PMID 19205716.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=15



paternal chromosomes



maternal chromosomes

Fig. 1. Distribución de ScoHET1 (rojo) en los espermatozoides de *S. coprophila* en la meiosis II. Los cromosomas L están intensamente marcados mientras que el resto de los cromosomas (II, III, IV y X) están teñidos en regiones cromosómicas discretas. Como resultado de la eliminación de cromosomas en la meiosis I, el grupo de cromosomas paternos están localizados en una zona citoplásmica protuberante.

Distribution of ScoHET1 (red) in a *S. coprophila* spermatocyte at meiosis II. L chromosomes (L) are strongly labelled whereas the rest of the chromosomes (II, III, IV, and X) are stained at discrete chromosomal regions. As a result of chromosome elimination in meiosis I, the group of paternal chromosomes are located in a cytoplasmic bud.



Susana Moreno Díaz de la Espina
Investigadora Científica
smoreno@cib.csic.es

Ph.D., 1975.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, DKFZ,
Heidelberg, Alemania.
Postdoctoral, NCI/NIH,
Frederick, MD, USA.
Científica Titular, 1979.
Investigadora Científica, 2002.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Malgorzata Ciska
Jose Ramón Cruz García
M^a Candelaria Pérez Munive
Mercedes Carnota Romero

Matriz Nuclear y Regulación de la Organización y Funcionalidad Nuclear Nuclear Matrix and Regulation of the Nuclear Organization and Function

El principal objetivo científico del laboratorio es el análisis del núcleo esqueleto vegetal, centrado en la caracterización de su proteoma y el ensamblaje de sus estructuras básicas. Hemos efectuado una contribución importante al campo con la caracterización de proteínas específicas de plantas y homólogos funcionales de laminas y NuMA. Actualmente estamos analizando las características y funcionalidad de la actina nuclear y sus proteínas asociadas, y proteínas nucleares estructurales específicas de plantas como NIFs y NMCP1.

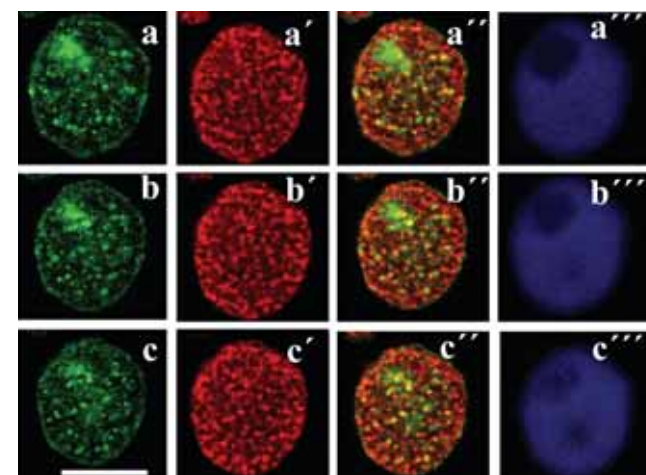
The group is mainly interested in analyzing the plant nucleoskeleton and particularly, in characterizing its proteome and the assembly of its basic structures. We have made substantial advances in the field by characterizing plant specific proteins and functional homologues of lamins and NuMA. We are currently investigating the characteristics and function of nuclear actin and its actin binding proteins, as well as plant specific nuclear structural proteins such as NIFs and NMCP1.

Nuestros resultados demuestran que el núcleo de *Allium cepa* contiene formas de actina con diferente solubilidad y distribución intranuclear, en su mayor parte no polimerizada, que están asociadas con los focos de transcripción y también con los filamentos del núcleo esqueleto (NSK) (Fig. 1; Cruz and Moreno Díaz de la Espina, 2008). La actina nuclear está modulada por diferentes proteínas de unión a actina (ABP). Solamente se han detectado tres ABPs nucleares en plantas: NMI, profilina y el factor de despolimerización de actina ADF. Estamos investigando la presencia de una nueva clase de ABPs estructurales nucleares, las proteínas semejantes a espectrina. Hemos demostrado la existencia de dos de ellas de 220 y 65 kDa que coimmunoprecipitan y colocalizan parcialmente con actina en el núcleo y podrían ser homólogos funcionales de nesprinas. Se localizan en la envuelta nuclear y los dominios inter cromatínicos y una de ellas está asociada al núcleo esqueleto (Fig. 2; Moreno Díaz de la Espina, 2008).

Los genomas vegetales carecen de ortólogos de los genes de las principales proteínas

Fig. 1. Colocalización de actina y su proteína motor NMI en el núcleo de *Allium cepa*. Secciones confocales consecutivas de un núcleo aislado mostrando el marcado con el anticuerpo anti-actina C15 en verde (a, b, c) y con el anti-NMI 3567 en rojo (a', b', c'). La superposición de los canales rojo y verde revela la colocalización en amarillo de actina y NMI en numerosos focos de transcripción nucleoplásmicos y nucleolares pero no en otras estructuras nucleares que contienen actina (a'', b'', c''). Tinción con DAPI de las secciones correspondientes mostrando los nucleolos no contrastados (a''', b''', c''').

Colocalization of actin and its motor protein NMI in *Allium cepa* nuclei. Consecutive nuclear confocal sections displaying anti-actin C15 antibody labeling in green (a, b, c) and anti-NMI labeling in red (a', b', c'). Overlaying the corresponding green and red channels show colocalization of actin and NMI in numerous yellow nucleoplasmic and nucleolar transcription foci, but not in other nuclear structures containing actin (a'', b'', c''). DAPI counterstaining of the corresponding confocal sections shows non-contrasted nucleoli (a''', b''', c''').



estructurales del NSK animal como laminas, LAPs y proteínas largas expandibles, y parecen haber desarrollado proteínas específicas para el control de la organización nuclear. En este campo nos hemos concentrado en el estudio de proteínas de tipo filamentos intermedios nucleares (NIFs) principalmente en una NIF de 65 kDa de la lámina y endoesqueleto, y también en las proteínas NMCP1 codificadas por la familia génica LITTLE NUCLEI (LINC) en *Arabidopsis* que controla la forma y organización nuclear y el número y distribución de los cromocentros.

Our results show that *Allium cepa* nuclei contain actin forms with different solubility and intranuclear topology, most of which are in a non-polymerized state and that are associated with transcription foci or with the filaments of the nucleoskeleton (NSK) (Fig. 1; Cruz and Moreno Díaz de la Espina, 2008). Nuclear actin is modulated by different actin binding proteins (ABP) of which only three nuclear ABPs have been identified in plants: NMI, profilin and the actin depolymerising factor ADF. We have investigated the presence of a new class of structural nuclear ABPs, the spectrin-like proteins. We demonstrated the existence of two main 220 and 65 kDa spectrin-like proteins that co-immunoprecipitate and partly co-localize with actin in onion nuclei, and that could be functional homologues of nesprins. These proteins localize to the nuclear envelope and interchromatin domains, and one of them is associated with the NSK (Fig.2; Moreno Díaz de la Espina, 2008).

Plant genomes lack orthologues of the genes encoding the main structural proteins of the animal NSK, such as lamins, LAPs and long expandable proteins. Indeed, they appear to have evolved specific proteins for the control of nuclear and genome organization. We concentrate our efforts on the study of nuclear intermediate filament proteins (NIFs) and mainly on a 65 kDa NIF of the onion lamina and endoskeleton. In addition, we are interested in NMCP1 proteins encoded by the LITTLE NUCLEI (LINC) gene family in *Arabidopsis* that control nuclear size and organization, as well as chromocentre number and distribution.

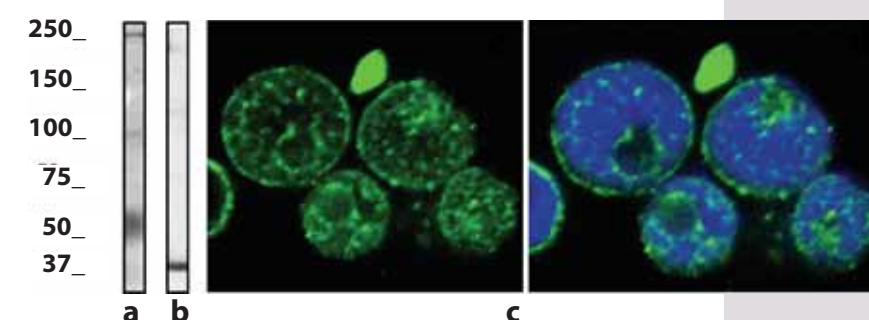


Fig. 2. a: Identificación de las proteínas semejantes a espectrina de 240 y 65 kDa en una fracción de proteínas nucleares de la población meristemática radicular de *Allium cepa* mediante WB con el anticuerpo anti-espectrina 1390. b: Demostración de la asociación de actina con estas proteínas mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo 1390 y western blot con el anti-actina C15. c: Distribución intranuclear de las proteínas semejantes a espectrina revelada con el mismo anticuerpo. d: Superposición de las imágenes correspondientes de inmunofluorescencia y tinción con DAPI.

a: Identification of the two spectrin-like proteins of 240 and 65 kDa in a nuclear protein fraction of the root meristematic population of *Allium cepa* by WB with the anti-spectrin 1390 antibody. b: Actin was detected in the immunoprecipitate obtained with 1390 antibody and probed in WB with the C15 antibody. c: Intranuclear distribution of the spectrin-like proteins revealed by immunofluorescence with the same antibody. d: Overlay of the corresponding immunofluorescence and DAPI images.



Jorge Bernardo Schwartzman Blinder
Profesor de Investigación
schwartzman@cib.csic.es

Ph.D., 1979.
Universidad Politécnica de Madrid.
Postdoctoral, 1979-1982.
Brookhaven National Laboratory, New York, USA.
Postdoctoral, 1988-1991.
Albert Einstein College of Medicine, New York, USA.
Científico Titular, 1985.
Investigador Científico, 2002.
Profesor de Investigación, 2007.
CIB, CSIC.

Investigadores del equipo | Staff Scientists:

Pablo Hernández Valenzuela
Dora Beatriz Krimer Smunis

Otros Miembros | Other lab Members:

Zaira García Fernández
Doris Gómez Flores
Virginia López Martínez
María Luisa Martínez Robles
María Estefanía Monturus de Carandini
María Rodríguez López
María Tenorio Gómez

Biología Molecular de los Cromosomas Molecular Biology of the Chromosomes

Nos interesa la interrelación y coordinación entre los procesos biológicos en los que el DNA está involucrado: replicación, transcripción, reparación y recombinación, cómo están regulados y cómo modifican o son afectados por factores genéticos, epigenéticos y ambientales como la topología del DNA, la organización de la cromatina y el estrés.

We are interested in the relationships and the coordination between biological processes involving DNA: replication, transcription, repair and recombination. Specifically, we study how these processes are regulated and how they alter or are affected by genetic, epigenetic and environmental factors such as DNA topology, chromatin organization and stress.

Iniciación, elongación, bloqueo, terminación y topología de la replicación del DNA. Estudiamos la mecánica de la replicación en plásmidos bacterianos, YACs (cromosomas artificiales de levaduras) y cromosomas de organismos superiores. Nos interesa no sólo identificar orígenes, términos y barreras para el progreso de las horquillas, sino también los cambios topológicos que experimenta el DNA durante la replicación y la segregación. Nuestro objetivo a largo plazo es construir cromosomas artificiales que puedan ser utilizados como vectores estables para transformar células de plantas y animales.

Bloqueo de la diferenciación en células eritroleucémicas. La integración del complejo vírico Friend cercana al promotor del gen *Sfpi* provoca la activación del factor de transcripción PU.1, probable causa del fenotipo eritroleucémico. Estudiamos la expresión de PU.1 y cambios en la topología del DNA en líneas parentales y resistentes a agentes inductores tanto en células proliferantes como a lo largo del proceso de diferenciación inducida.

Barreras para las horquillas de replicación e inestabilidad del DNA. La parada accidental de las horquillas de replicación es una causa importante de inestabilidad genómica. También existen paradas naturales de las horquillas en sitios específicos, como en los genes del rRNA, cuya alta conservación indica que juegan un papel relevante aún no muy bien conocido. Estudiamos la regulación de estas barreras naturales y su papel en la recombinación homóloga, la progresión del ciclo celular y su relación con la respuesta a distintos tipos de estrés.

Initiation, Elongation, Blockage, Termination and Topology of DNA Replication. Our aim is to characterize the mechanics of DNA replication in bacterial plasmids, YACs (Yeast Artificial Chromosomes) and the complex chromosomes of higher eukaryotes. Our interest not only focuses on the identification of origins, replication fork barriers and termini, but also on the topological changes that occur during DNA replication and segregation. Our long-term goal is to build up artificial chromosomes that could be used as stable vectors to transform plant and animal cells.

Differentiation Blockage in Erythroleukaemia Cells. Integration of the Friend complex virus upstream of the promoter of the *Sfpi-1* gene leads to the activation of the transcription factor PU.1, which could be responsible for the transformed phenotype. We analyze the expression of PU.1 and changes in DNA topology in parental and resistant cell lines during proliferation and differentiation.

Replication Fork Barriers and DNA Instability. Accidental arrest of the replication forks is an important cause of genome instability. Natural barriers have also been identified at specific sites, like the rRNA-coding genes. Their high conservation indicates they play a relevant role, although this is still poorly understood. We study the regulation of these natural barriers and their role in homologous recombination, cell cycle progression and cell responses to different types of stress.

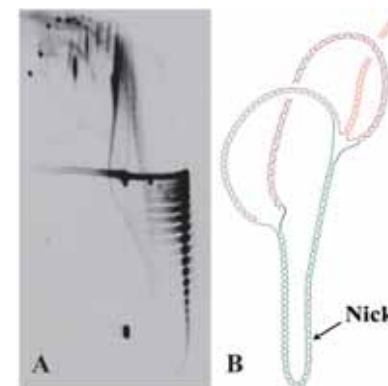


Fig. 1. A) Análisis del superenrollamiento y encadenamiento de plásmidos bacterianos por electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia del agente intercalante cloroquina. B) Esquema que ilustra el regreso de una horquilla de replicación en un plásmido bacteriano parcialmente replicado.

A) Supercoiling and catenation of bacterial plasmids analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of the intercalating agent chloroquine. B) Cartoon illustrating the regression of a replication fork in a partially replicated bacterial plasmid.

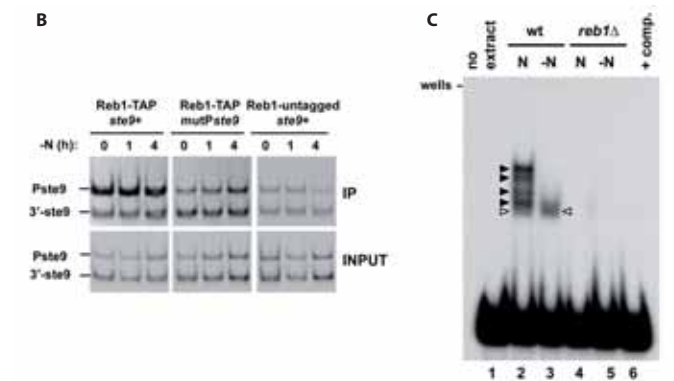
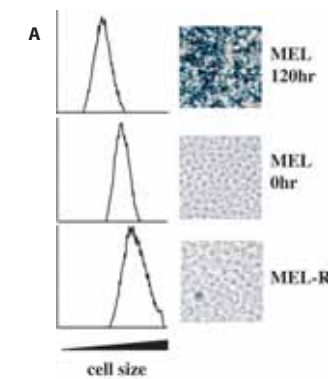


Fig. 2. A) Aumento del tamaño celular en células resistentes a HMBA (MEL-R). Células MEL-R y MEL no tratadas (0 h) o tratadas con HMBA durante 5 días (120 h) fueron analizadas por citofotometría de flujo. A la derecha, alícuotas de las mismas muestras teñidas con benzidina para detectar diferenciación. B) Inmunoprecipitación de cromatina en la que se muestra que la proteína de unión al rDNA Reb1 también se une in vivo al promotor del gen *ste9+* y promueve su sobre-expresión. *Ste9* (ortólogo de *hCDH1*) es el activador de APC/C en la fase G1 y es requerido para la diferenciación sexual. C) Ensayos de cambio de movilidad electroforética en los que se muestra la formación de complejos proteicos mediados por Reb1 en el promotor de *ste9+* en células creciendo en medio mínimo completo (+N). Bajo condiciones de estrés nutricional (-N), la mayoría de las proteínas excepto Reb1 se disocian, lo que promueve la sobre-expresión de *ste9+*.

A) Increased cell size in MEL cells resistant to HMBA (MEL-R). MEL-R and MEL cells untreated (0 h) or treated with HMBA for 5 days (120 h) were analyzed by flow cytometry. To the right, aliquots of the same samples were tested for differentiation by the benzidine assay. B) Chromatin immunoprecipitation showing that the fission yeast rDNA-binding protein Reb1 also binds to the promoter of the *ste9+* gene (*Pste9*) in vivo and promotes its expression. *Ste9* (orthologue of *hCDH1*) is the activator of APC/C in G1 phase and it is required for sexual differentiation. C) Electrophoresis mobility shift assays showing the formation of Reb1-mediated protein complexes at the promoter of *ste9+* in cells growing in complete minimal medium (+N). In conditions of nutritional stress (-N), most proteins except Reb1 dissociate and overexpression of *ste9+* takes place.



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Fernández-Nestosa, M.J., Hernández, P., Schwartzman, J.B., and Krimer, D.B. (2008). PU.1 is dispensable to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Leukemia Res.* 32, 121-130.

Mayán-Santos, M.D., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Schwartzman, J.B., and Krimer, D.B. (2008). A redundancy of processes that cause replication fork stalling enhances recombination at two distinct sites in yeast rDNA. *Mol. Microbiol.* 69, 361-375.

Schwartzman JM and Schwartzman JB (2008). How do we ask for money? A view of funding for basic research. *EMBO reports* 9, 216-220.

Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2007). Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. *J. Biol. Chem.* 282, 18190-18196.

Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D.B., Stasiak, A., and Schwartzman, J.B. (2007). Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1500-1505.

Mayán-Santos, M.D., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2007). DNA is more negatively supercoiled in bacterial plasmids than in minichromosomes isolated from budding yeast. *Electrophoresis* 28, 3845-3853.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo_publicaciones.php?idgrupo=2





Pedro Esponda Fernández
Investigador Científico
esponda@cib.csic.es

Ph.D., 1979.
Universidad de Córdoba.
Profesor Agregado Contratado, 1973-1981.
Universidad Autónoma de Madrid.
Research Associate, 1982-1985.
Cornell University Medical College, USA.
Profesor Asociado, 1990-1999.
Universidad de Alcalá de Henares.
Investigador Científico, 1981.
CIB, CSIC.



Juan F. Giménez Abián
Científico Titular
gimenezjf@cib.csic.es

Ph.D., 1992.
Universidad Autónoma de Madrid.
Postdoctoral, 1992-1994.
University of Cambridge, UK.
Guest Scientist, 2001-2003.
IMP, Viena, Austria.
Guest Scientist, 2004-2006.
University of Minnesota, Minneapolis, USA.
Científico Titular, 2008.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Ascensión González Díaz
Iris Manosalva Peña

Reproducción Celular y Animal Cell and Animal Reproduction

Nuestro grupo estudia diferentes aspectos de los mecanismos de reproducción tanto a nivel celular como a nivel animal (organismo completo). En cuanto a reproducción animal nos hemos dedicado a estudiar los cambios producidos en el oocito durante su envejecimiento, así también hemos desarrollado sistemas para la transfección de gametos y del tracto reproductor masculino. Respecto a proliferación celular analizamos los mecanismos de cohesión y segregación cromosómica.

Different aspects of Cell and Animal (whole organism) Reproduction are currently being analyzed by our group. We study some of the changes produced in mammalian oocytes by ageing and we are developing techniques for the transfection of gametes and of the male genital tract. We also focus on the mechanisms for chromosome cohesion and segregation during cell proliferation.

Reproducción Animal.

Se estudian diversos aspectos del proceso reproductivo en algunos animales. Estos estudios se han centrado en tres temas:

- 1) Cambios provocados por el envejecimiento en oocitos de mamíferos. Se han analizado algunos cambios que ocurren en el núcleo del gameto femenino. En particular hemos estudiado la aparición de apoptosis así como alteraciones en algunos factores epigenéticos. Se sugiere que dichas alteraciones podrían incidir en la escasa fertilidad que muestran los oocitos envejecidos.
- 2) Transfección de gametos y desarrollo de transgénicos en algunos invertebrados. Se han desarrollado con éxito metodologías para obtener larvas transgénicas en mejillones y almejas, empleando como base la transfección de los gametos masculinos y femeninos.
- 3) Transferencia génica *in vivo* del tracto reproductor masculino de mamíferos. Empleando diversas construcciones génicas se ha transfectado *in vivo* el epidídimo del ratón. Se ha provocado la aparición de un porcentaje de células epiteliales que expresan el transgen, así como la expresión de otro transgen en la secreción del fluido epididimario con posibles consecuencias para la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Reproducción Celular.

Estudiamos los diferentes mecanismos de cohesión entre cromátidas hermanas y su pérdida regulada en la anafase mitótica. Analizamos tanto la ruta de liberación de cohesinas y su dependencia del punto de chequeo del huso, como los mecanismos de control celular del proceso de decatenación de cromátidas hermanas por parte de la topoisomerasa II.



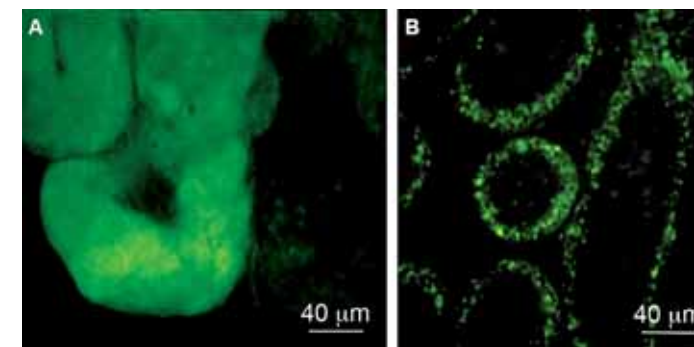
Animal Reproduction.

Studies on the reproductive mechanism of certain animals are focused in three main areas.

- 1) Changes in the mammalian oocyte induced by ageing. We have analyzed some of the changes that occur in the aged oocyte and in particular apoptotic modifications and changes in some epigenetic factors. These changes seem to be related to the low fertilizing capacity of these aged oocytes.
- 2) Gamete transfection and transgenics in some invertebrates. We have developed methods to transfect male and female gametes of some Bivalve Molluscs and we have collected transgenic larvae from these animals.
- 3) *In vivo* gene transfer in the mammalian male genital tract. Using different gene constructs, the epithelium of the mouse epididymis has been transfected *in vivo* and a large number of epithelial cells express the transgene used. We also managed to express other transgenes in the secretion of the epididymal fluid, which may be relevant to modify the fertilizing capacity of the male gamete.

Cell Reproduction.

Different mechanisms for sister chromatid cohesion and the loss of cohesion at anaphase onset are studied. We analyze the biochemical pathway that removes cohesins from chromosomes depending on the spindle assembly checkpoints, as well as the cell cycle mechanisms that regulate topoisomerase II-mediated decatenation of sister chromatids.



Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

Díaz-Martínez, L.A., Giménez-Abián, J.F. and Clarke, D.J. (2008). Chromosome cohesion: Rings, Knots, Orcs and Fellowship. **J. Cell Sci.** 121(13), 2107-2114.

Carballada, R., Jara, M.A., and Esponda, P. (2007). Photoperiod induced apoptosis in the male genital tract epithelia of the golden hamster. **Int. J. Androl.** 30, 73-79.

Díaz-Martínez, L.A., Giménez-Abián, J.F., and Clarke, D.J. (2007). Regulation of centromeric cohesion by Sororin independently of the APC/C. **Cell Cycle** 6(6), 714-724.

Díaz-Martínez, L.A., Giménez-Abián, J.F., and Clarke, D.J. (2007). Cohesin is dispensable for centromere cohesion in human cells. **PLoS ONE** 2(3), e318, 1-12.

Ver más: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=19

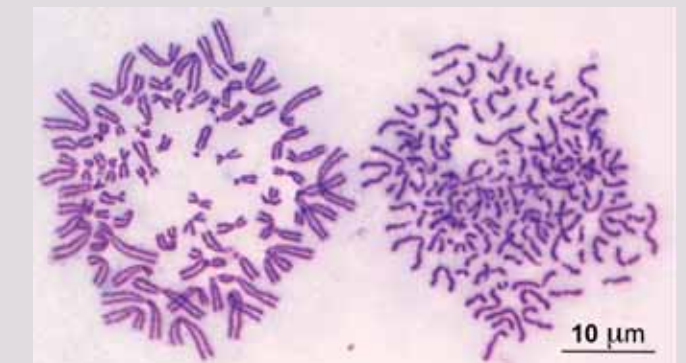
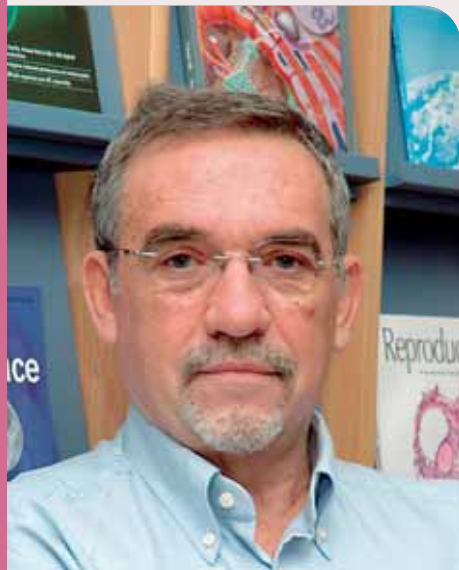


Fig. 1. Células mitóticas HeLa tras la depleción de Sororina, a la izquierda célula con cohesión entre cromátidas hermanas, a la derecha una célula carente de cohesión.

Mitotic HeLa cells after Sororin depletion. A cell displaying cohesion between sister chromatids (left) and one lacking chromosome cohesion (right).

Fig. 2. Transfección *in vivo* del epidídimo de ratón. A: Visión in toto de un epidídimo transfectado con una construcción génica que expresa la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Aparecen algunos túbulos (como el de la izquierda) que expresan intensamente el transgen mostrándose muy fluorescentes. B: Corte realizado por congelación de un epidídimo similar al de la Fig. A. Se observa fluorescencia verde en algunas células epiteliales del epitelio epididimario.

In vivo transfection of the mouse epididymis: A: In toto image of an epididymis transfected with a Green Fluorescent Protein gene construct (GFP). Some epididymal tubules show strong fluorescence (left). B: Cryosection of an epididymis similar to that in Fig. A. Some epithelial cells fluoresce brightly.



Jesús del Mazo Martínez
Investigador Científico
jdelmazo@cib.csic.es

Ph.D., 1978.
Universidad Complutense de Madrid.
Postdoctoral, CALTECH, 1987-1989.
Pasadena L.A., California, USA.
Científico Titular, 1981.
Investigador Científico, 2006.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

David B. Cárdenas Sanjur
Sergio Martínez Fernández
Jesús García López
Macarena Quesada López

Biología Molecular de la Gametogénesis Molecular Biology of Gametogenesis

La gametogénesis es un proceso de diferenciación terminal de células especializadas que finaliza en la formación de gametos. El control de la diferenciación esta mediado por regulación de la expresión génica interaccionando con múltiples factores endocrinos paracrinos y autocrinos. Nuestro laboratorio desarrolla líneas de investigación enfocadas a la caracterización de mecanismos moleculares que, a través de expresión génica, controlan la diferenciación y desarrollo de ovocitos, espermatozoides y primeras etapas postzigóticas.

Gametogenesis is the terminal differentiation of specific cells ending in the generation of gametes. This differentiation process is controlled by regulating gene expression and through interactions with multiple endocrine, paracrine and autocrine factors. We are interested in characterising the molecular mechanisms that control the development of oocytes, spermatozoa and the postzygotic stages through differential gene expression.

La viabilidad de las células germinales requiere mecanismos de regulación génica específica. En los últimos años, hemos enfocado nuestro trabajo al análisis y caracterización de tal regulación específica en gametogénesis, usando ratón como modelo y diferentes abordajes experimentales incluyendo: generación de genotecas de cDNA de células gametogénicas específicas; caracterización de los genes clonados; análisis de la expresión génica por microarrays y métodos citológicos; perfiles proteómicos y generación de ratones transgénicos.

Recientemente, iniciamos también el análisis del papel de RNAs nucleares de pequeño tamaño (snRNA) en gametogénesis y etapas postzigóticas preimplantacionales. Mediante shRNAs, hemos abordado estudios de "silenciamiento génico" exógeno por interferencia de RNA (RNAi), tanto *in vitro* como *in vivo*, en células del epitelio seminífero. Asimismo, estamos analizando la biogénesis y degradación de microRNAs (miRNAs) y su funcionalidad en gametogénesis y embriogénesis temprana. La caracterización de miRNAs diferenciales de expresión gamética a zigótica, es también una de nuestras investigaciones actuales.

Numerosos informes indican detrimento de la calidad y cantidad espermática tanto en humanos como en animales silvestres, asociado al incremento de cáncer testicular y de disfunciones gonadales. Contaminantes medioambientales tales como compuestos denominados "disruptores endocrinos" (DEs) se señalan como potenciales causantes de tales

disfunciones. Nuestro grupo continúa estudios de desregulación génica, incluyendo miRNAs, en gónadas de animales expuestos a DEs durante el desarrollo y su posible efecto transgeneracional por mecanismos epigenéticos.

Nuestro grupo también presta apoyo experimental y colaboración en proyectos de genómica funcional comparativa entre protozoos parásitos y organismos hospedadores y el efecto sobre expresión génica de compuestos parasitocidas.

Germ cell viability depends on specific mechanisms of gene regulation. In recent years, we have focused our attention on characterising the specific regulation of gene expression during gametogenesis in the mouse, using approaches that include: production of cDNA libraries from specific gametogenic cells; subtractive cDNA libraries; molecular analysis of cloned genes; analysis of gene expression by cytological and microarray techniques; proteomic profiles; and the generation of transgenic mice. Recently, we began to analysis the role of small nuclear RNAs (snRNAs) in gametogenesis and in pre-implantation postzygotic development. Using shRNAs, we performed studies of exogenous "gene silencing" by iRNA interference (RNAi), both *in vivo* and *in vitro*, in cells from the seminiferous epithelium. We are currently analyzing the biogenesis and degradation of microRNAs (miRNAs) and their functional roles in gametogenesis and early embryogenesis. Characterizing the differential expression of miRNAs from gametes to zygotes is also ongoing.

Numerous reports indicate that the decrease in the quality and quantity of sperm in both humans and wild animals is associated to an increase in testicular cancer and gonadal dysfunctions. Environmental contaminants such as the so-called "endocrine disrupters" (EDs) have been proposed as a potential cause of such dysfunction. Our group is studying gene deregulation in the gonads of animals exposed to EDs, as well as the reported transgenerational effect of these through epigenetic mechanisms.

We also provide technical support and collaborate in projects involved in comparative functional genomics between parasitic protozoa and host organisms, as well as the effects of parasiticide compounds.

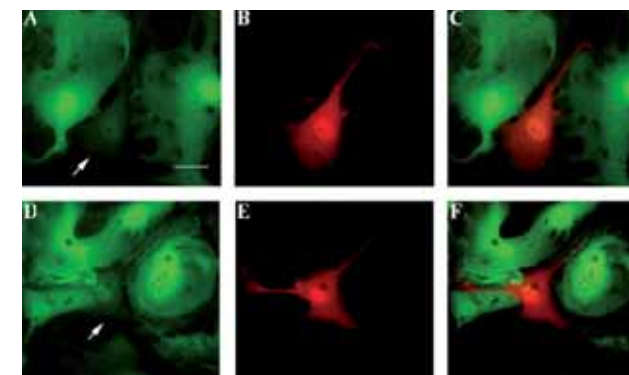


Fig. 1. Silenciamiento génico en células de Sertoli de ratones transgénicos que expresan proteína verde fluorescente EGFP. Las células transfectadas *in vitro* con el vector pGtoR expresan proteína Red (roja fluorescente) y shRNAs capaz de inducir silenciamiento de EGFP por RNAi.

Gene silencing in Sertoli cells from transgenic mice expressing the green fluorescent protein, EGFP. Cells transfected *in vitro* with the pGtoR vector express the Red protein (red fluorescent) and shRNAs to silence EGFP by RNAi.

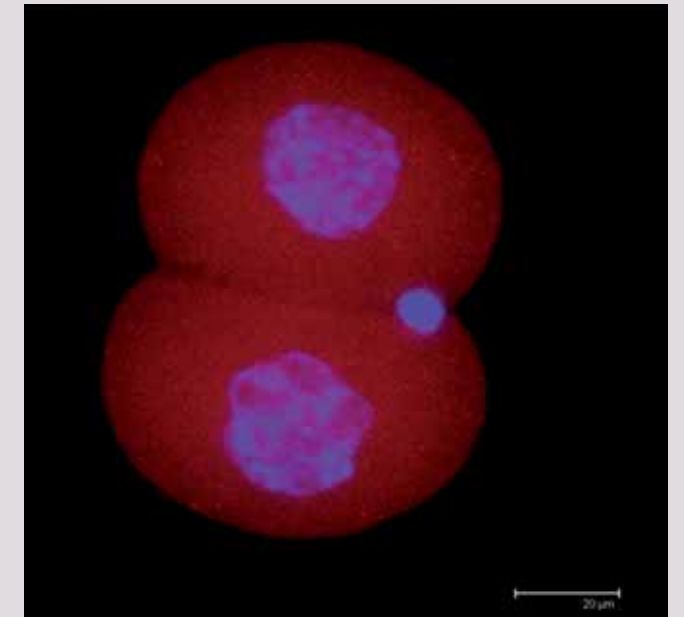
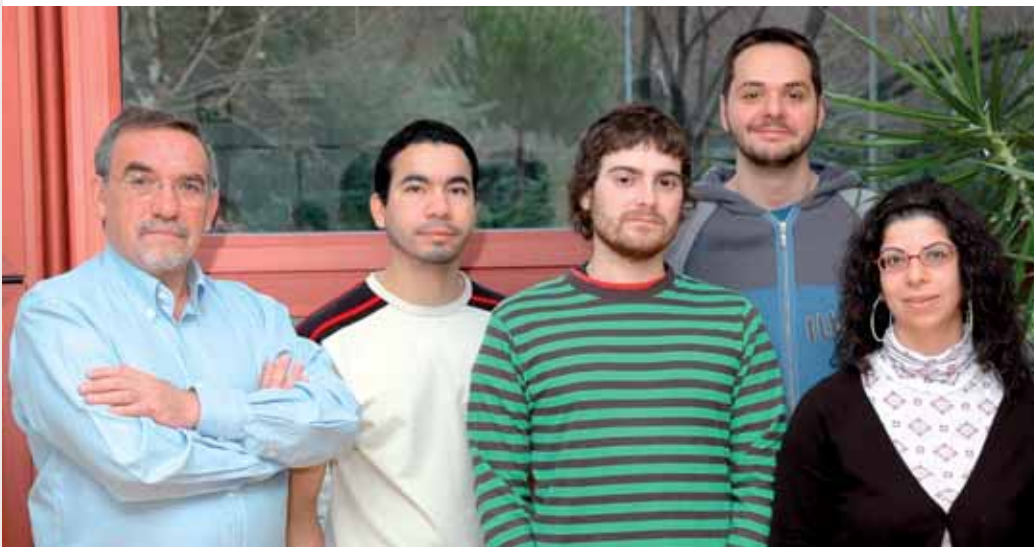


Fig. 2. Distribución uniforme de la proteína Tudor-SN (miRNasa implicada en degradación de mirRNAs) en embrión de ratón de 2 células. Inmunofluorescencia en microscopía confocal. Núcleos teñidos con Hoechst. Uniform distribution of the Tudor-SN protein (miRNase involved in miRNA degradation) in the 2-cell mouse embryo. Immunofluorescence detected by confocal microscopy with Hoechst nuclear staining.



**Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications**

González-González, E., López-Casas, P.P., and del Mazo, J. (2008). The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. **Biochim. Biophys. Acta - Gene Reg. Mech.** 1779/5, 306-311.

González-González, E., López-Casas, P.P., and del Mazo, J. (2008). Gene silencing by RNAi in mouse Sertoli cells. **Reprod. Biol. Endoc.** 6, 29 (BioMed Central) doi:10.1186/1477-7827-6-29. <http://www.rbej.com/content/6/1/29>.

Mejía-Jaramillo, A.M., Arboleda-Sánchez, S., Rodríguez, I.B., Cura, C., Salazar, A., del Mazo, J., Triana-Chávez, O., and Schijman, A.G. (2008). Geographical clustering of *Trypanosoma cruzi* I groups from Colombia revealed by low-stringency single specific primer-PCR of the intergenic regions of spliced-leader genes. **Paras. Res.** (DOI 10.1007/s00436-008-1212-0).

Mizrak, S.C., Renault-Mihara, F., Párraga, M., Bogerd, J., van de Kant, H.J.G., Paz, M., López-Casas, P.P., del Mazo, J., and de Rooij, D.G. (2007). Phosphoprotein enriched in astrocytes-15 is expressed in mouse testis and protects spermatocytes from apoptosis. **Reproduction** 133(4), 743-751.

Paz, M., López-Casas, P.P., and del Mazo, J. (2007). Changes in vinexin expression patterns in the mouse testis induced by developmental exposure to 17beta-estradiol. **Biol. Reprod.** 77(4), 605-613.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=18



Lucas Sánchez Rodríguez
 Profesor de Investigación
 lsanchez@cib.csic.es

Ph.D., 1976.
 Universidad Complutense de Madrid.
 Postdoctoral, 1977-1979.
 Zoological Institute, University of Zürich, Suiza.
 Investigador Asociado, 1979-1981.
 Zoological Institute, University of Zürich, Suiza.
 Jefe de grupo, 1981-1984.
 European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania.
 Científico Titular, 1985, Investigador Científico, 1989 y
 Profesor de Investigación, 2004.
 CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

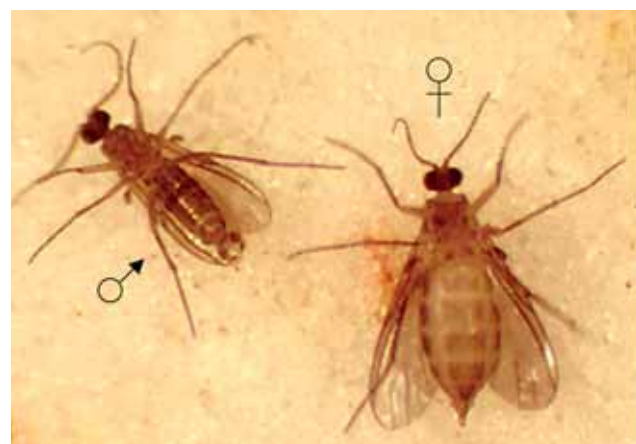
M. Fernanda Ruiz Lorenzo
 Mercedes Álvarez García
 Iker Martín Sánchez
 Dolores Mateos Moya
 Francesca Sarno

Evolución de los Mecanismos de Determinación Sexual en Insectos Evolution of Sex Determining Mechanisms in Insects

La determinación sexual es un proceso de desarrollo que da lugar a hembras y machos, los cuales son distintos desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de conducta. Nuestro proyecto analiza cómo los mecanismos de determinación sexual han evolucionado. Debido a que todos los mecanismos de determinación sexual están representados en los insectos, éstos constituyen un modelo experimental excepcional para el estudio evolutivo de dichos mecanismos.

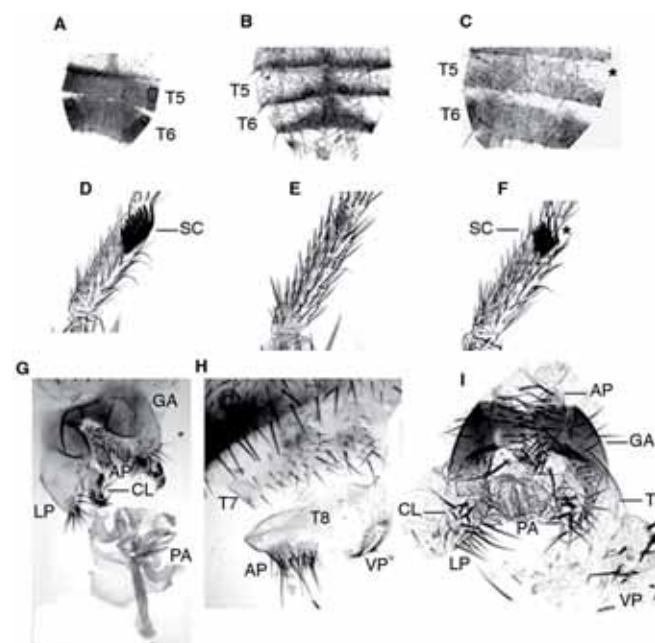
Sex determination is the developmental process that gives rise to morphologically, physiologically and behaviourally distinct males and females. Our goal is to understand how sex determination mechanisms evolved. Due to the plethora of different mechanisms controlling sex determination in insects, these are a particularly interesting group of animals in which to study this issue.

La evolución de los mecanismos de determinación sexual se puede articular en torno a dos grandes cuestiones. Cuestión 1: Buscar en otros insectos los genes ortólogos de los que forman la cascada de determinación sexual en *Drosophila*, y comparar cuánto se ha modificado dicha cascada entre las especies más ancestrales de los insectos y el linaje evolutivo más reciente de los drosófilidos. Los objetivos concretos correspondientes a esta cuestión son: caracterizar los genes *transformer-2* y *fruitless* en varias especies de *Anastrepha* (Orden Diptera, Suborden Brachicera, Familia Tephritidae), y el gen *doublesex* y *transformer-2* de *Sciara* (Orden Diptera, Suborden Nematocera, Familia Sciaridae). Cuestión 2: Identificar en otros insectos los genes, no homólogos de los de *Drosophila*, que controlan la determinación sexual en esos insectos. Los objetivos concretos correspondientes a esta cuestión son: caracterizar el gen(es) que codifica para el factor materno que controla el número de cromosomas X eliminados en el embrión de *Sciara*, e identificar en este insecto los genes, no homólogos de los de *Drosophila*, que controlan su determinación sexual. Además, estamos analizando la evolución molecular del gen *Sex-lethal*, el cual controla la determinación sexual y la compensación de dosis génica en los drosófilidos. Los resultados obtenidos ayudarán a entender la base genética subyacente a la evolución de la determinación sexual, así como de otros procesos de desarrollo.



Sciara ocellaris

We study the evolution of sex-determining mechanisms by two approaches. In the first approach, we aim to determine how much of the sex determination genetic cascade found in *Drosophila* has been modified from the more ancient insect phylogenetic lineages and the drosophilid lineage. Specifically we search several species of *Anastrepha* (Diptera Order, Brachicera Suborder, Tephritidae Family) for the genes orthologous to *transformer-2* and *fruitless*, and the gene orthologues of *doublesex* and *transformer-2* in *Sciara* (Diptera Order, nematocera Suborder, Sciaridae Family). On the other hand, we search for unidentified sex-determination genes in insects that are not orthologous to those identified in *Drosophila*. Specifically we aim to characterise the maternal-effect gene(s) of *Sciara* that control the number of X chromosomes eliminated and to search *Sciara* for the sex determination genes that are not orthologous to the *Drosophila* sex determination genes. Moreover, we are analysing the molecular evolution of the *Sex-lethal* gene that controls sex determination and dosage compensation in drosophilids. The results obtained will contribute to our understanding of the evolution of sex determining mechanisms, as well as other developmental genetic pathways.



**Publicaciones Seleccionadas
 Selected Publications**

Sánchez, L. (2008). Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 837-856.

Sánchez, L., Chaouiya, C., and Thieffry, D. (2008). Segmenting the fly embryo: logical analysis of the role of the Segment Polarity cross-regulatory module. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 1059-1075.

Ruiz, M.F., Eirín-López, J.M., Stefani, R.N., Perondini, A.L.P., Selivon, D., and Sánchez, L. (2007). The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Dev. Genes Evol.* 217, 725-731.

Ruiz, M.F., Milano, A., Salvemini, M., Eirín-López, J.M., Perondini, A.L.P., Selivon, D., Polito, L.C., Saccone, G., and Sánchez, L. (2007). The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE* 2(11), e1239.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=17

Fig. 1. Análisis morfológico de moscas de *Drosophila melanogaster* transgénicas para el gen *transformer* de *Anastrepha obliqua* (moscas de las frutas). A, D, G: macho silvestre. B, E, H: hembra silvestre. C, F, I: Macho transgénico. Símbolos: SC, peine sexual; T5, tergito 5; T6, tergito 6; T7, tergito 7, T8, tergito 8; VP, placas vaginales; GA, arco genital; LP, placas laterales, CL, claspers; PA, aparato del pene incluyendo el pene y el hipandrium; AP, placas anales.

Morphological analysis of *Drosophila melanogaster* flies expressing the *transformer* gene of *Anastrepha obliqua* (fruit flies). A, D, G: Wild type male. B, E, H: Wild type female. C, F, I: Transgenic XY male. Symbols: SC, sex comb; T5, tergite 5; T6, tergite 6; T7, tergite 7, T8, tergite 8; VP, vaginal plates; GA, genital arch; LP, lateral plates, CL, claspers; PA, penis apparatus comprising penis proper and hypandrium; AP, anal plates.





Miguel Angel Vidal Caballero
Investigador Científico
mvidal@cib.csic.es

Ph.D., 1985.
Universidad Complutense.
Postdoctoral, 1985-1989.
Medical Research Council, London, UK.
Científico Titular, 1991.
Investigador Científico, 2008.
CIB, CSIC.

Otros Miembros | Other lab Members:

Gema González
Mónica Román-Trufero
Carmen Sánchez Lasheras
Inés Sánchez Navas Parejo
Jon Schoorlemmer

El Sistema Polycomb de Regulación Epigenética

Epigenetic Control by the Polycomb Group of Genes

El grupo investiga la actividad epigenética del grupo de genes Polycomb (PcG). Los productos PcG son modificadores de cromatina evolutivamente conservados. inicialmente considerados sólo como reguladores del desarrollo embrionario. Trabajo reciente, sin embargo, muestra que su actividad también afecta al control de la impronta genómica, de la autorenovación de células madre y del desarrollo tumoral.

The group is interested in the epigenetic control exerted by the Polycomb group (PcG) of genes, some of which we identified for the first time. The PcG genes encode a set of evolutionary conserved chromatin modifiers initially known to act as developmental regulators. They have since been shown to act in a wide range of processes such as genomic imprinting, stem cell maintenance and self renewal, and cancer development.

Nuestro trabajo está enfocado en la función de Ring1A y Ring1B, subunidades identificadas en el laboratorio y que subsecuentemente se ha mostrado que son necesarias para la monoubiquitinación de la histona H2A (una modificación asociada a represión transcripcional). Utilizamos ratones con mutaciones constitutivas/inducibles, en los genes Ring1A y Ring1B. También estudiamos la diversidad de complejos que contienen Ring1A/Ring1B y la función de una de sus subunidades, RYBP.

Para investigar la contribución de Ring1B a la homeostasis celular estudiamos como modelo el sistema hematopoyético adulto (en colaboración con C. Calés, IIB-UAM). Hemos identificado una función antiproliferativa en la expansión de progenitores mieloides, así como una función represora del supresor tumoral Ink4a que permite la expansión de precursores linfoides y mieloides. Estamos extendiendo el estudio a la contribución del parólogo Ring1A.

Por otro lado, estudiamos la función de Ring1B en células madre utilizando como modelo las células troncales neurales del bulbo olfatorio (en colaboración con C. Vicario, I. Cajal, CSIC). Este trabajo muestra que el mantenimiento de la capacidad de autorenovación de estas células depende de la prevención por Ring1B de la activación de programas de diferenciación. Estamos investigando los mecanismos moleculares de este proceso, así como el papel modulador de diferenciación nerviosa a lo largo del desarrollo.

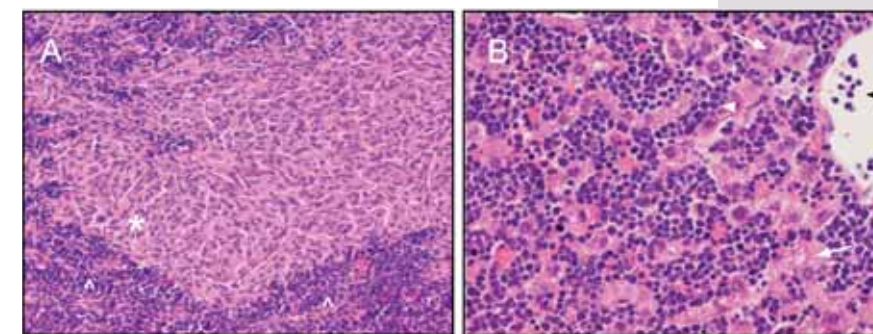
Finalmente, la identificación proteómica de nuevos complejos Ring1A/Ring1B PcG ha conducido a la identificación de subunidades nuevas de las que una, conteniendo repeticiones de dominios WD, está siendo investigada.

We focus on the function of Ring1A and Ring1B, the PcG subunits that act as E3 ligases in histone H2A monoubiquitylation, a chromatin mark associated to transcriptional repression. These studies rely on genetic analysis using mouse models of constitutive/conditional loss of function of the *Ring1A* and *Ring1B* genes. We are also characterizing the ever expanding variety of Ring1A/Ring1B-containing complexes and the function of one of these subunits, the RYBP protein.

To investigate the contribution of Ring1 proteins to cell homeostasis in the adult we are using the haematopoietic compartment as a model (work being done in collaboration with C. Calés, IIB, CSIC-UAM, Madrid). We found that Ring1B acts as an antiproliferative regulator in the expansion of maturing myeloid progenitors. In addition, Ring1B also represses the tumour suppressor locus that encodes Ink4a, thereby contributing to the appropriate expansion of lymphoid and myeloid precursors. By analyzing compound mutant mice, we are now studying the contribution of its paralogue, Ring1A, to hematopoietic homeostasis.

To study the role of Ring1B in stem cells we have chosen the neural stem cells of the olfactory bulb as our model system (studies that have been initiated in collaboration with C. Vicario, Cajal I., CSIC). Our findings show that maintenance of stem cell self-renewal is based on Ring1B preventing the activation of differentiation. Additional work is addressing its role in timely differentiation during development and the identification of regulated targets in stem cells.

Finally, proteomic approaches have identified two new Ring1A/Ring1B complexes, one subunit of which, a protein containing WD40-repeats, is being actively studied.



Publicaciones Seleccionadas
Selected Publications

Calés, C., Román-Trufero, M., Pavón, L., Serrano, I., Melgar, T., Endoh, M., Pérez, C., Koseki, H., and Vidal, M. (2008). Inactivation of the Polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated to Ink4a deletion. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1018-1028.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A.P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., and Koseki, H. (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* 135, 1513-1524.

Sánchez, C., Sánchez, I., Demmers, J.A., Rodríguez, P., Strouboulis, J., and Vidal, M. (2008). Proteomic analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx10/Jhdml1B histone demethylase and the BcoR corepressor. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 820-834.

Vidal, M. (2008). Chromatin modifications by Polycomb complexes, in *Epigenetics in Biology and Medicine*. (Esteller, M. ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, US, pp 131-154. ISBN: 978-0-8493-7289-6.

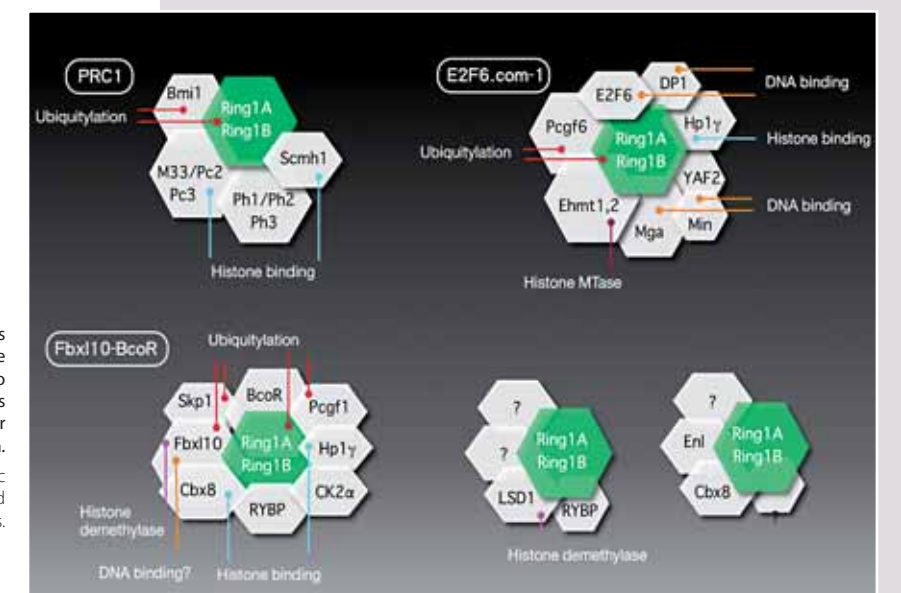
Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, M., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in ES cells. *Nat. Cell. Biol.* 9, 1428-1435.

Ver más en: www.cib.csic.es/es/grupo.php?idgrupo=14

Fig. 1. Infiltración de bazo (A) e hígado (B) por tumores desarrollados tempranamente en ratones doble deficientes en Ring1B e Ink4a. Células tipo histiocito (*) infiltradas entre tejido normal de bazo (A). Blastos (cabezas de flecha) ocupando tejido hepático (flechas). Spleen (A) and liver (B) tissues from Ring1B and Ink4a compound mutant mice with a shorter onset of tumour development. Histiocytic infiltrates (*) between normal spleen cells (A). Lymphoblastoid cells (arrowheads) infiltrating between normal hepatocytes (arrows).

Fig. 2. Complejos Ring1A/Ring1B identificados por análisis proteómico. Los complejos PRC1 y E2F6.com1 eran conocidos de purificaciones convencionales. Se indican las subunidades, así como sus funciones conocidas o estimadas por asociación. Las subunidades correspondientes a polipéptidos no caracterizados están marcadas por símbolos de interrogación.

Murine Ring1A/Ring1B protein complexes identified by proteomic approaches showing the subunit names and their known or associated functions. Question marks refer to uncharacterized subunits.



SCIB ÍNDICE



Animalario Animal Facility	140
Biblioteca Library	140
Citometría de Flujo Flow Cytometry	141
Cromatografía Chromatography	142
Cultivo de Células Animales Animal Cell Culture	142
Esterilización y Cocina de Medios Sterilization & Culture Media Preparation	142
Microscopía Confocal y CCD Confocal Microscopy & CCD	144
Microscopía Electrónica Electron Microscopy	145
Servicio de Protección Radiológica Radiation Safety Service	145
Proteómica y Genómica Proteomics & Genomics	146
Química de Proteínas Protein Chemistry	146
Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares Analytical Ultracentrifugation & Macromolecular Interactions	147
Secuenciación proporcionado por SECUGEN Sequencing Facility provided by SECUGEN	166

Servicio de Animalario | Animal Facility

Responsable Científico | Head Scientist:
Dr. Jesús del Mazo Martínez

Responsable Técnico | Head Technician:
Manuel Moreno Calle

Otros Miembros | Other Members:
Marta Cereceda Díaz
Isabel González Fernández
María Herrera Hernández
Esther López Mimbela
Daniel del Olmo Fernández
Cristina Pintos Maestro
Esther Sánchez Jiménez



El animalario del CIB cuenta con unas modernas instalaciones, adecuadas a las exigencias de las legislaciones española y comunitaria, para la producción y el mantenimiento de animales de laboratorio. Consta de 3 áreas: zona de barrera (SPF), zona de investigación y zona de cuarentena, en las que se mantienen los animales de las especies y estirpes necesarias para los diferentes proyectos de investigación del Centro. Cuenta con personal especializado para colaborar con los investigadores en cuantas tareas necesiten, relacionadas con la manipulación, inoculación, extracción de fluidos o toma de muestras de los animales quienes realizan también la rederivación de líneas procedentes de otros centros, mediante transferencia de embriones y, a petición de los investigadores, la criopreservación de embriones de las líneas de especial significación y la producción de anticuerpos poli y monoclonales.

The CIB animal facility is a modern installation in accordance with the Spanish and European regulations for breeding and husbandry laboratory animals. The facility is divided in three different areas: SPF, research and quarantine area. In these areas are maintained animals from different species and strains to fit researchers needs. The animal facility is run by a team of skilled technicians in order to assist researchers in experimental tasks. This personnel is also dedicated to embryo transfer of mouse streaming from external laboratories at investigator demand, as well to embryo cryopreservation for special interesting streaming and production of polyclonal and monoclonal antibodies.



Servicio de Citometría de Flujo | Flow Cytometry Service

Responsable Científico | Head Scientist:
Dr. Pedro Lastres Varo

Otros Miembros | Other Members:
José Fernando Escolar Antúnez

El servicio de citometría de flujo fue creado en 1988 como instrumento de apoyo a la comunidad científica en el campo de la biología celular. Actualmente el servicio está equipado con dos analizadores, modelos EPIC XL y FC500 y un "cell sorter" modelo FACS Vantage, además de medios para el manejo de muestras y el análisis de resultados (microscopio de epifluorescencia, de contraste de fases, campana de flujo laminar, software de análisis, etc.). Las aplicaciones más frecuentes que se llevan a cabo son:

- Inmunofenotipaje celular
- Estudios de viabilidad celular
- Análisis del potencial de membrana mitocondrial
- Análisis del ciclo celular
- Señalización celular
- Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS)
- Estudios de pH intracelular y flujos de Ca²⁺
- Separación celular en las aplicaciones descritas anteriormente

Biblioteca | Library

Responsable Científico | Head Scientist:
Pilar Sánchez Testillano

Responsable Técnico | Head Technician:
Olvido Partearroyo Lacaba

Otros Miembros | Other Members:
Nieves Fonturbel Cabañas
Victoria Ortiz Rodríguez
Miguel Soto Estébanez

Angeles Sacristán Martín
Milagros Rodríguez Bueno
M^a Jesús Garabito Seco

La Biblioteca del CIB, de referencia en Biología y Biomedicina en España por la calidad y extensión de su fondo bibliográfico (8.700 libros, 1.353 revistas), está integrada en la red de Bibliotecas del CSIC y su catálogo: http://aleph.csic.es/F?func=file&file_name=find-b.

Su prioridad es el apoyo a la investigación en el CIB.

Proporciona:

- Consultas bibliográficas y lectura en sala (25 puestos, wi-fi).
- Acceso a recursos electrónicos dentro y fuera del CIB (PAPI).
- Gestión de adquisición, clasificación, catalogación, préstamo de libros y revistas (papel, electrónicos) e interbibliotecario, preservación de fondos.
- Búsquedas bibliográficas, bibliométricas y documentales.
- Puesta en valor del Legado Bibliográfico del Prof. G. Marañón: digitalización, encuadernación, consulta bajo autorización y normativa.
- Reprografía y encuadernación.

The CIB Library, a reference in Biology and Biomedicine in Spain for the quality and extent of their bibliographic funds (8,700 books, 1353 journals), is integrated into the CSIC Libraries network and catalogue: http://aleph.csic.es/F?func=file&file_name=find-b.

Its priority is to support research in the CIB. Services and activities:

- Bibliographic searching and literature reading room (25 seats, wi-fi).
- Access to e-resources indoor and outdoor of CIB (PAPI).
- Management of the acquisition, classification, cataloguing and loan of books and journals (print, electronic), interlibrary loan, preservation of funds.
- Bibliographic, bibliometric and documental searches.
- Highlighting the bibliographic legacy of Prof. G. Marañón: digitization, rebinding, and policy consultation with permission.
- Copying and binding.



Flow cytometry service started on 1988 aimed to support necessities of the scientific community in cellular biology. At the moment, the service is equipped with two analysers, EPICS XL and FC500 and a FACS Vantage cell sorter, as well as complementary facilities for samples and results management (epifluorescence and phase contrast microscopes, tissue culture hood, analytical software, etc.). The most frequent applications carried out are:

- Cellular immunophenotyping
- Cell viability studies
- Analysis of mitochondrial membrane potential
- Cell cycle analysis
- Cellular signaling
- Detection of reactive oxygen species (ROS)
- Monitoring of intracellular pH and Ca²⁺ fluxes
- Cell sorting in the applications described above

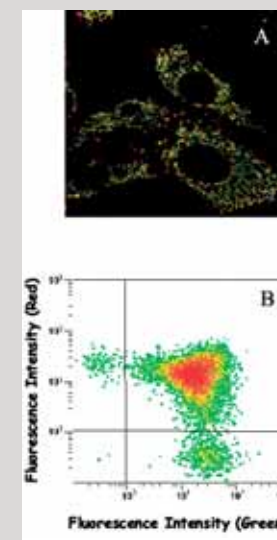


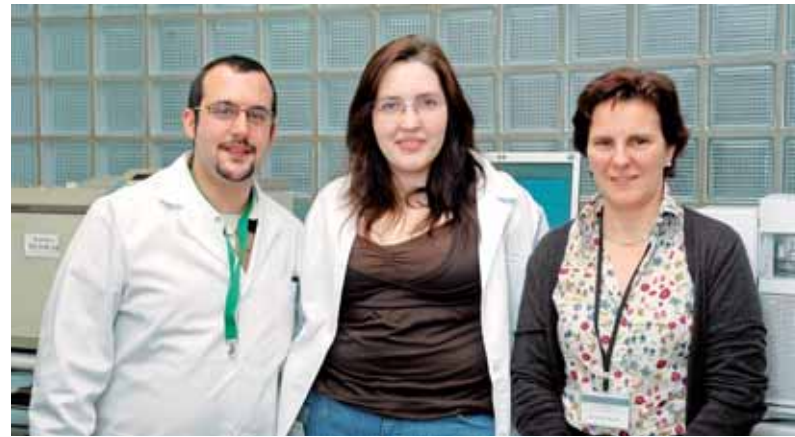
Fig. 1. Tinción celular con la sonda fluorescente JC-1 utilizada para el estudio del potencial de la membrana mitocondrial. (A) Imagen de microscopía confocal (adaptado de Molecular Probes). (B) Histograma biparamétrico de citometría de flujo. La fluorescencia verde corresponde a la presencia del fluorocromo en el citoplasma celular y la fluorescencia roja corresponde a su forma molecular acumulada en las mitocondrias.

Cellular staining with the mitochondrial membrane potential probe JC-1. (A) Confocal microscope image (adapted from Molecular Probes). (B) Flow cytometry dot plot. The presence of fluorochrome in the cytoplasm is detected as green fluorescence and the molecular form accumulated in mitochondria is detected as red fluorescence.

Cromatografía Chromatography

Responsable Científico | Head Scientist:
Alicia Prieto Orzanco

Otros Miembros | Other Members:
José Luis Martínez San Martín



El Servicio de Cromatografía del CIB cuenta con dos instrumentos:

Cromatógrafo de gases (Autosystem, Perkin-Elmer) con detector FID e inyector split/splitless.

Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas cuadrupolar (GC-MS 7980A-5975C, Agilent) con inyector split/splitless e ionización por impacto electrónico.

Estos equipos permiten la separación, identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles en mezclas complejas. Los análisis rutinarios más demandados por los usuarios están relacionados con el análisis de carbohidratos, TMS derivados de diferentes tipos de muestras, esteroides, alcoholes, compuestos quirales, VFAs o polihidroxicanoatos, y a demanda de los usuarios, se pueden crear nuevos protocolos.

The Chromatography Facility at CIB counts on two instruments:

Gas chromatograph (Autosystem, Perkin-Elmer) with FID detector and split/splitless injection.

Gas chromatography-mass spectrometry system (GC-MS) 7980A-5975C from Agilent with split/splitless injection, EI ionization and quadrupolar mass analyzer.

These instruments allow the separation, identification and quantification of the components of a volatile sample as well as of liquid samples which can be vaporized without decomposition. The most demanded analysis deal with carbohydrate analysis, TMS derivatives of several types of samples, esters, alcohols, chiral compounds, VFAs or polihydroxicanoates. Other protocols are set up on users demand for special applications.

Servicio de Cultivo de Células Animales Animal Cell Culture Facility

Responsable Científico y Técnico | Head of facility:
Dra. Blanca T. Pérez Maceda

El Servicio de Cultivo de Células Animales del CIB es un servicio que proporciona apoyo científico-técnico en cultivo de células humanas y animales, tanto a usuarios del CIB como a usuarios externos.

En el servicio se llevan a cabo las siguientes actividades:

Banco de células animales y humanas, que se encuentran a disposición de la comunidad científica, pudiendo ser solicitadas al servicio cuando se precisen.

Detección de micoplasmas en líneas celulares y medios de cultivo, mediante tinción DNA-Hoescht utilizando la línea celular Vero como indicadora (Figura A y B).

Eliminación de micoplasmas de cultivos contaminados.

Selección de Suero Fetal Bovino por un período entre 18–24 meses para la reserva general del CIB.

The Animal Cell Culture facility of the CIB is a scientific and technical support facility of human and animal cell culture for CIB and external users.

This laboratory offers the following activities:

The human and animal cell Bank: this human and animal cell collection has been established to make the cells available to the scientific community.

Mycoplasma testing: Cell lines and culture media can be tested for mycoplasma contamination by Hoescht-DNA stain using Vero cells as indicator (Figure A and B).

Mycoplasma elimination from contaminated cell lines.

Fetal Bovine Serum Selection: the laboratory selects general batch/batches of FBS for the research community of CIB and for a period of 12-24 months.

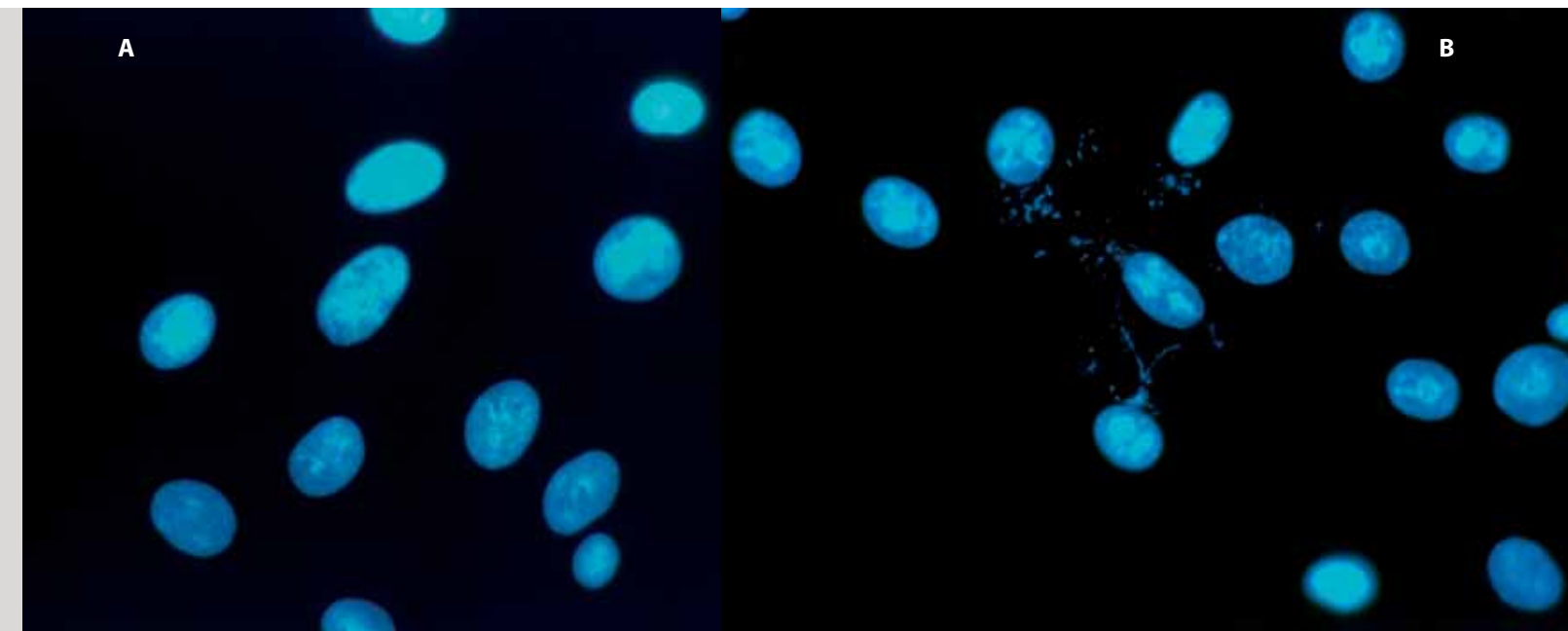


Fig. 1. A.- Control negativo tinción micoplasmas. Se observan sólo los núcleos teñidos de las células Vero

B.- Detección de micoplasmas en sobrenadante contaminado utilizando la línea Vero como célula indicadora.

A.- Vero cells mycoplasma free. Negative Control. Hoescht-DNA stain.

B) Vero cells cocultivated with a contaminated supernatant. Mycoplasma positive. Hoescht-DNA stain.

Esterilización y Cocina de Medios Sterilization & Culture Media Preparation

Responsable Científico | Head Scientist:
Dr. Eduardo Díaz Fernández

Otros Miembros | Other Members:
M^a Rosa Díaz López
Gabino García Amaya
Virginia Quesada Guerrero

El Servicio de Esterilización del CIB es el encargado de esterilizar, mediante calor seco (160°C/230°C) o húmedo (120°C/110°C), el material de trabajo o de desecho (residuos biológicos o de otro tipo), de los distintos grupos de investigación.

El servicio de Cocina de Medios está asociado al servicio de Esterilización y cuenta con todo el equipamiento necesario para la preparación y almacenamiento de medios de cultivo, tampones y soluciones estériles, incluyendo soluciones libres de RNAsas para el trabajo con RNA.

The Sterilization Service of the CIB is devoted to sterilize, through dry (160°C/230°C) or wet heat (120°C/110°C), the working material and wastes (biological residues, etc.) of the different research groups.

The Culture Media Preparation Service is associated to the Sterilization Service and it has all the necessary equipment for preparation and storage of culture media, buffers, and sterile solutions, including RNase-free solutions for working with RNA.



Servicio de Microscopía Confocal y CCD

Confocal and CCD Microscopy Service

Responsable Científico | Head Scientist:
Prof. M^a del Carmen Risueño Almeida

Otros Miembros | Other Members:
M^a Teresa Seisdedos Domínguez
Silvia Hernández Esteban
José Luís Martínez Sanmartín
Fernando González Camacho

Descripción de la instalación, objetivos y técnicas.

- CLSM Leica TCS-SP2, 9 líneas láser. Sistemas AOTF y AOB. Facilidad de observación UV y amplio rango GFPs. FRET, FRAP y otros análisis dinámicos.
- Cámara CCD Leica DFC350-FX sobre MO Zeiss Axioplan.
- CLSM BioRad MCR 1024 sobre MO Axiovert 135 Zeiss.
- Sistema Microscopía Multidimensional avanzada de fluorescencia alta velocidad in vivo imaging Leica AF6000 LX: MO invertido DMI6000B. Cámara incubación termostatzada, CO2. Cámara Hamamatsu-9100-O2 EM-CCD alta sensibilidad, ultrarrápida para imágenes multidimensionales XY, Z, T, experimentos multiposición, generación imágenes compuestas. Análisis dinámicos in vivo de FRET, ratiométricos de calcio y otros. Deconvolución, reconstrucción-3D.
- Stock de fluorocromos a bajo coste. Servicio a Grupos: 40 CIB, 10 otros OPIs. Impartición de Cursos.



Equipment Description, aims and techniques.

- Leica CLSM TCS-SP2, 9 laser lines, AOTF, AOB systems. UV and wide range of GFPs. FRET, FRAP and other dynamic analysis.
- Leica CCD camera DFC350-FX on LM Zeiss-Axioplan.
- BioRad CLSM MCR-1024, inverted LM Zeiss-Axiovert-135.
- Multidimensional Microscopy System advanced in fluorescence and transmitted light Leica AF6000LX for live cell imaging. Inverted LM-DMI6000B. Incubation camera, CO2 and temperature controlled. High resolution. ultrafast Hamamatsu-9100-02-EM-CCD-camera, for multiple adquisición XY, Z, T, multiposition experiments and generation of composite overview images. FRET and ratiometrics calcium in vivo and other dynamic studies. Deconvolution and 3D images-creation.
- A wide range stock of fluorochromes at a low-cost. Service to groups: 40 of CIB and 10 from other institutes.

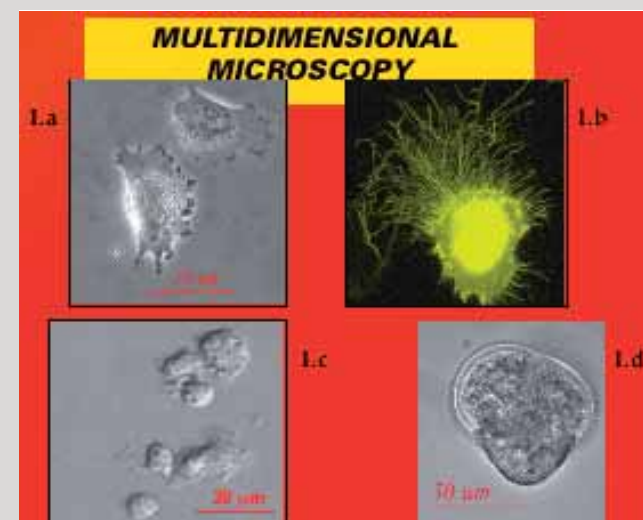


Fig 1 Microscopía multidimensional "in vivo imaging". 1.a. Células de melanoma Contraste de fase; 1.b. Células de melanoma transfectadas con pEYFP-CXCR4. Teixidó, J. y Colo, G.; 1.c. Células dendríticas de ratón. Rodríguez, J.L.; 1.d. Embrión de polen de colza inducido por estrés. Solis, M.T., Prem, D., Risueño, M.C. y Testillano, P.S.

Multidimensional microscopy "in vivo imaging", 1.a. Melanoma cells. Phase contrast. 1.b. Melanoma cells transfected with pEYFP-CXCR4. Teixido, J., and Colo, G.; 1.c. Murine dendritic cells. Rodríguez, J.L.; 1.d. Stress-induced-pollen-embryo, Solis, M.T., Prem, D., Risueño, M.C., and Testillano, P.S.

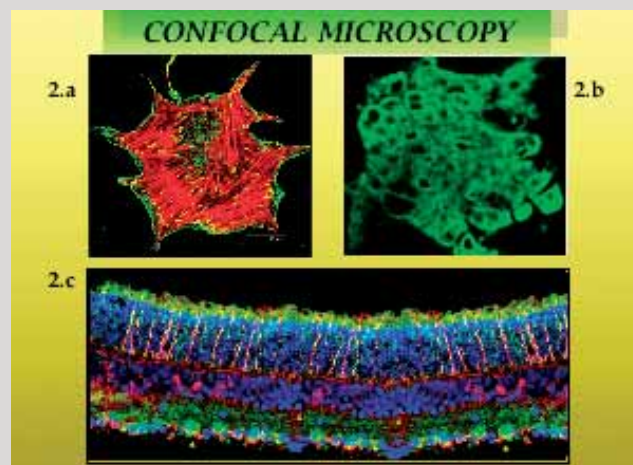


Fig 2 Microscopía Confocal, 2.a Inmunofluorescencia de célula CHO (Chinese Hamster Ovary Cell) adherida a una matriz de fibrinógeno, transfectada con una variante mutada de la integrina plaquetaria α IIb β 3. La subunidad β 3-718P favorece la formación de clusters del receptor y focos de adhesión. Objetivo 63x. Verde (A488): subunidad β 3; Rojo (A568): F-actina. Jayo, A., Conde, I., González-Machón, C.; 2.b FISH Ltp2 en embrión de polen de maíz inducido por estrés. Testillano, P.S., Risueño, M.C.; 2.c Corte de retina de ratón adulto. Objetivo 63X. Rojo (TxR): marcador neuronal Tuj-1, Verde GFP-LC3: autofagosomas y azul (DAPI): núcleos. Boya, P. y Rodríguez-Muela, N./ Confocal Microscopy,

2.a CHO cell (Chinese Hamster Ovary Cell) adhesion to a fibrinogen matrix, transfected with platelet muted integrin α IIb β 3 (green) and F-actin (red). The subunit β 3-718P stimulates receptor clusters formation and focal adhesion. Objective 63x. Green (A488): subunit β 3; Red (A568): F-actin. Jayo, A., Conde, I., González-Machón, C. 2.b FISH Ltp2. in Stress-induced pollen mays, Testillano, P.S., Risueño, M.C.; 2.c Retinal Section in adult mouse. Objective 63x. Red (TxR): neuronal marker Tuj-1, Green GFP-LC3: autofagosomas and blue (DAPI); cell nucleus, Boya, P. and Rodríguez-Muela, N.

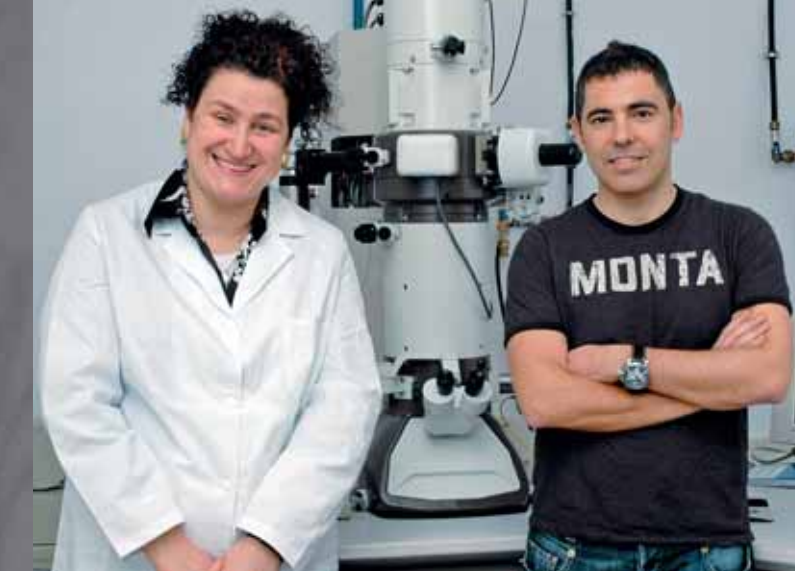
Servicio de Microscopía Electrónica

Electron Microscopy Unit

Responsable Científico | Head Scientist:
Dr. Concepción García Mendoza (- Dic. 2008)
Dr. Oscar Llorca (Dic 2008 -)

Responsable Técnico | Head Technician:
María del Carmen Terrón

El Servicio de Microscopía Electrónica ofrece la experiencia y el equipamiento necesarios para la observación de muestras biológicas utilizando desde los métodos convencionales de análisis a nivel celular, hasta avanzados métodos de observación de moléculas individuales, virus y filamentos preservados a temperaturas de nitrógeno líquido (crío-microscopía). El servicio cuenta con un moderno microscopio electrónico JEOL-1230 de 120 kV, varios microtomos, un evaporador POLARON y los adaptadores de GATAN necesarios para llevar a cabo los experimentos de crío-microscopía. El servicio de microscopía es utilizado por un gran número de grupos del CIB así como por un número significativo de usuarios pertenecientes a otras instituciones científicas. El uso y mantenimiento del equipamiento es llevado a cabo por un técnico, que enseña su manejo a los nuevos usuarios y les aconseja acerca de los métodos adecuados a sus objetivos experimentales. Además, realiza todo el trabajo necesario para el procesamiento de las muestras y el mantenimiento de los equipos.



The Electron Microscopy Unit offers the possibility of observing and analysing biological samples using conventional electron microscopy methods for studies at cellular resolution, and up-to-date cryo-electron microscopy (cryo-EM) procedures to study single molecules, viruses and filaments preserved at liquid nitrogen temperature. The EM Unit is equipped with a modern 120 kV JEOL-1230 electron microscope, microtomes, a POLARON evaporator, and the GATAN adapters required for cryo-EM experiments. The Unit is used by a large number of groups within the CIB, and also, a significant number of users belonging to other scientific Institutions. The use and maintenance of the equipment is performed by one technician, who trains new users and advises them in the methods needed to perform their research. She also participates in all the work required to process the samples and maintain the electron microscope.

Servicio de Protección Radiológica (SPR)

Radiation Safety Service (RSS)

Responsable Científico | Head Scientist:
Dra. Marta Cebrián Echarri

Otros Miembros | Other Members:
M. Carmen Doñoro Vázquez

El SPR del CIB controla la entrada y eliminación de material radiactivo en el Centro, su manipulación en las zonas autorizadas, los aparatos generadores de radiaciones ionizantes, las medidas de protección radiológica, la formación de los usuarios y el cumplimiento de las normas exigidas por el Consejo de Seguridad Nuclear.

La Instalación Radiactiva consta de una cámara caliente con zonas específicas para la manipulación de radioisótopos β , γ y para la realización de cultivos celulares, áreas autorizadas y delimitadas en laboratorios convencionales, generador de Rayos X, difractor de Rayos X, almacenes de residuos y cuarto de contadores. Se pueden realizar técnicas donde se utilicen compuestos radiactivos no encapsulados marcados con ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{33}P , ^{45}Ca , ^{32}P , ^{86}Rb , ^{125}I y ^{51}Cr , Sales de Uranilo o Rayos X.

The RSS controls the acquisition, storage and disposal of radioactive materials in the CIB, their manipulation in authorized areas and the use of X-Ray generators. The RPS performs all radiological safety measurements and trains new users in radiological protection protocols. Also implements the regulations of the Spanish Nuclear Security Council.

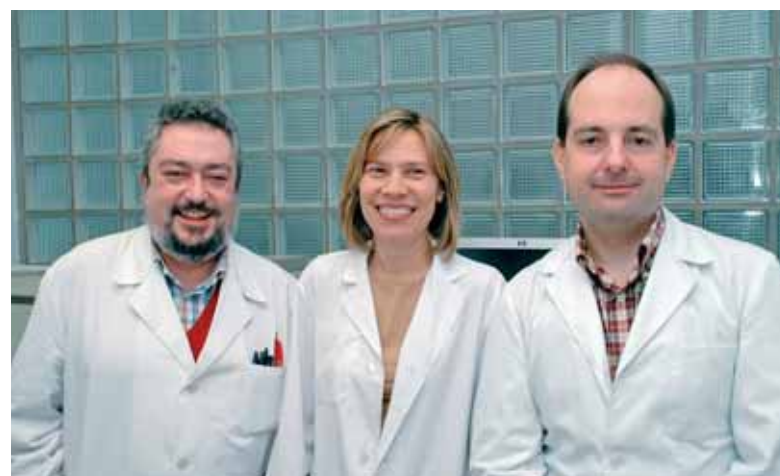
The radioactive installation consists of a Central hot room with specific areas to cellular cultures and manipulation of β or γ radioisotopes, authorized workings areas in ordinary laboratories, X-Ray generator and X-Ray diffractometer, storages of radioactive waste and scintillation counter room. It is possible to realize techniques with labelled compounds with ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{33}P , ^{45}Ca , ^{32}P , ^{86}Rb , ^{125}I and ^{51}Cr , Uranyl salts and X-Ray.



Unidad de Proteómica y Genómica The Genomics and Proteomics Unit

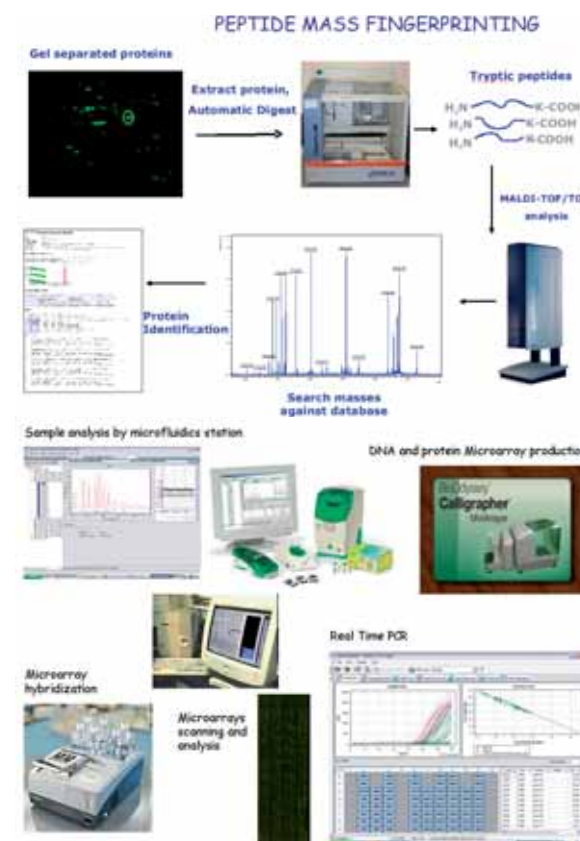
Responsible Científico | Head Scientist:
Dr. Ignacio Casal

Otros Miembros | Other Members:
Vivian de los Ríos
Andrés Fernández
Francisco García Tabares



La unidad de Proteómica y Genómica del CIB ofrece los siguientes servicios básicos. En el área de genómica: i) Determinación de calidad de muestras de RNA y/o DNA (sistema Experion (Bio-Rad)), ii) PCR cuantitativa (iQ5, Bio-Rad) y iii) sistema de impresión y análisis de chips de DNA y proteínas (Bio-Rad). En proteómica: i) geles bidimensionales en diferentes tamaños y con diferentes tinciones (Bio-Rad), ii) determinación de masa molecular de péptidos y proteínas y iii) identificación de proteínas por determinación de huella peptídica y secuenciación por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF (Autoflex III, Bruker). En 2009 se espera incorporar un espectrómetro de masas/masas acoplado a una fuente de electrospray y un equipo de cromatografía líquida para la realización de proteómica cuantitativa e identificación de modificaciones post-traduccionales. En 2008, la unidad se incorporó como miembro asociado a la plataforma Proteored (Genoma-España).

The genomics and Proteomics Unit at the CIB offers the following basic services. In the Genomics area: i) Determination of RNA and DNA sample quality (Experion system, Bio-Rad), ii) Quantitative PCR (iQ5, Bio-Rad) and iii) a system for printing and analyzing DNA and protein chips (Bio-Rad). In Proteomics: i) Two-dimensional gels in different sizes and different stainings (Bio-Rad), ii) molecular mass determination in peptides and proteins and iii) protein identification by peptide mass fingerprinting and sequencing using MALDI-TOF-TOF spectrometry (Autoflex III, Bruker). In 2009, we expect to incorporate tandem mass spectrometry coupled to an electrospray source and liquid chromatography equipment for quantitative proteomics and post-translational modification analysis. In 2008, the unit joined the proteomic platform Proteored (Genoma-España) as associated member.



Servicio de Química de Proteínas Protein Chemistry Facility

Responsible Científico | Head Scientist:
Dr. Guillermo Giménez Gallego

Responsible Técnico | Head Technician:
Javier Varela Espinosa

Otros Miembros | Other Members:
María Dolores Alonso Guirado

Emilia Aporta Sosa

El servicio de Química de Proteínas tiene como función prestar apoyo científico técnico a los grupos de investigación en la purificación, cuantificación, identificación y caracterización de proteínas. Para ello cuenta con el siguiente equipamiento:

- Dos secuenciadores de proteínas (Applied Biosystems, Procise 494). Permiten establecer la secuencia amino terminal de péptidos y proteínas mediante degradación secuencial de Edman.
- Sintetizador de péptidos (Applied Biosystems, Synergy).
- Sintetizador de oligonucleótidos (Applied Biosystems 3400).
- Analizador de aminoácidos (Biochrom 30). Permite determinar cuantitativamente la composición de aminoácidos de hidrolizados de péptidos y proteínas.
- Cromatógrafos de líquidos. Equipo de alta presión (0-25 MPa) HPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), equipo de media presión (0-5 MPa) FPLC (Pharmacia) y equipo de baja presión (0-1 MPa), (ÄKTA prime, Amersham Pharmacia Biotech).
- LC-MS. HPLC (Surveyor Plus) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (Thermo Scientific).

The core Protein Chemistry Facility is a state-of-the-art laboratory designed to aid researchers in the separation, quantitation, identification and characterization of proteins from any biological sample using the following equipment:

- Two protein sequencers (Applied Biosystems, Procise 494). It can identify the amino terminal sequence of peptides and proteins by means of Edman's sequential degradation.
- Peptide synthesizer (Applied Biosystems, Synergy).
- Oligonucleotide synthesizer (Applied Biosystems 3400).
- Amino acid analyzer (Biochrom 30). It determines quantitatively the amino acid composition of peptide and protein hydrolysates.
- Liquid chromatography. High pressure (0-25 MPa) equipment HPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), medium pressure (0-5 MPa) equipment FPLC (Pharmacia) and low pressure (0-1 MPa) equipment (ÄKTA prime, Amersham Pharmacia Biotech).
- LC-MS. Surveyor plus HPLC system coupled to an LXQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific). The LXQ is designed for drug discovery, proteomics, forensics, and a variety of industrial applications.



Laboratorio de Ultracentrifugación Analítica Laboratory of Analytical Ultracentrifugation



Responsible Científico | Head Scientist:
Dr. Germán Rivas Caballero

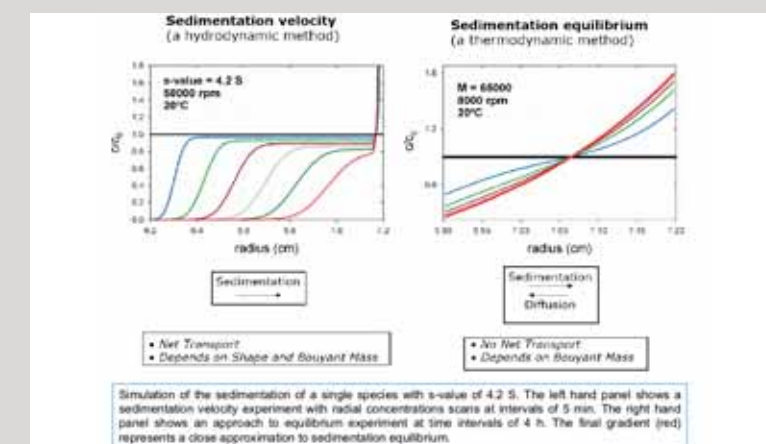
Responsible Técnico | Head Technician:
Carlos Alfonso Botello

Otros Miembros | Other Members:
David González López
Noelia Roperio

El laboratorio centra su actividad en el análisis biofísico de complejos macromoleculares mediante técnicas de ultracentrifugación analítica (equilibrio y velocidad de sedimentación) y dispersión de luz (dinámica y estática), que son poderosas herramientas para determinar el tamaño, la forma global aproximada y el grado de homogeneidad de proteínas y otras macromoléculas biológicas en disolución. Estos métodos están especialmente adaptados para la detección y el análisis cuantitativo (estequiometría, afinidad y reversibilidad) de interacciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares (proteína-proteína, proteína-ADN, receptor-ligando).

The laboratory is focused in the biophysical analysis of macromolecular complexes by means of techniques of analytical ultracentrifugation (sedimentation equilibrium and velocity) and light scattering (dynamic and static), which are powerful tools to determine the size, the approximate overall shape and the degree of homogeneity of proteins and other biological macromolecules in solution. These methods are specially adapted for the detection and quantitative analysis (stoichiometry, affinity, reversibility) of interactions leading to the formation of macromolecular complexes (protein-protein, protein-DNA, and receptor-ligand).

Ver más: http://www.cib.csic.es/es/servicio_ultracentrifugacion_analitica



CIB

INDICE

Jubilaciones Retirements	150
Tesis Doctorales Ph.D. Thesis	152
Premios y Distinciones Awards and Honors	156
Proyectos Especiales Special Projects	157
Seminarios del CIB CIB Seminars	158
Visitantes Especiales Special Visitors	160
Jornadas científicas en el CIB CIB Simposia	160
Bibliografía Publications	162
Spin-offs Spin-offs	166
Servicio Técnico y Personal Servicios Generales Technical Service and General Facilities Personnel	168
Organigrama CIB CIB Structure	170
Edificios Velázquez y Ramiro de Maeztu Old Building & New Building	172
Localización CIB Location CIB	174
Directorio CIB - Encarte CIB Directory - Inset	

Jubilaciones Retirements

Proliferación celular Cell Proliferation



40 AÑOS DE ACTIVIDAD EN
EL CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS (1968-2008)

40 YEARS OF ACTIVITY AT
THE CIB (1968-2008)

Consuelo de la Torre García-Quintana
PROFESORA DE INVESTIGACIÓN

Realicé mi tesis doctoral en el CIB, dirigida por el Prof. Gonzalo Giménez-Martín. Después de estancias en las Universidades de Oxford y Oregón, inicié el estudio de la regulación de proliferación celular en plantas. Considero que mi mayor aportación a este campo ha sido la demostración de que las rutas de chequeo promueven, en lugar de evitar, la aparición de inestabilidad genómica.

After finishing my doctoral thesis in the CIB, under Prof. Giménez-Martín direction, I moved to the Universities of Oxford and Oregon. Upon return, I initiated the study of plant cell proliferation. I do consider my most relevant contribution to the field to have proven that checkpoints promote instead of discarding genome instability.



Publicaciones Favoritas Favorite Publications

De la Torre C, Fernández-Gómez ME, Giménez-Martín G. (1975) Rate of nucleogenesis as a measure of gene activity. **Nature** 256: 503-505.

Carballo JA; Pincheira J, De la Torre C. (2006) The G2 checkpoint activated by DNA damage does not prevent genome instability in plant cells. **Biol. Res.** 39: 331-340.

Bioquímica de Hongos Biochemistry of Fungi



47 AÑOS DE ACTIVIDAD
EN EL CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS (1961-2008)

47 YEARS OF ACTIVITY AT
THE CIB (1961-2008)

Concepción García Mendoza
INVESTIGADORA CIENTÍFICA

A lo largo de mis 47 años perteneciendo al CIB, primeramente realizando mi Tesis Doctoral bajo la dirección de J. R. Villanueva, seguida de una estancia postdoctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, y a continuación regresando al CIB, mi investigación se ha enmarcado dentro de la Química Microbiana. Mis contribuciones han versado sobre la obtención y reversión de protoplastos de levaduras y hongos filamentosos, la estructura y función de las paredes celulares fúngicas y el micoparasitismo de hongos superiores comestibles.

During my 47 years appointed at the CIB, firstly doing my Doctoral Thesis directed by J. R. Villanueva, followed by a postdoctoral period in the Department of Biochemistry at Cambridge University, and successively returning to the CIB, I have worked in the research field of the Chemical Microbiology. My contributions have dealt with yeast and mold protoplast production and reversion, fungal cell wall structure and function, and mycoparasitism on edible higher fungi.

C. GARCÍA MENDOZA y M. NOVAES-LEDIEU Chitin in the new wall of regenerating protoplasts of *Candida utilis*. **Nature** (Lond.) (1968) 220, 1035.

C. GARCÍA MENDOZA, M. A. AVELLÁN, E. SÁNCHEZ y M. NOVAES-LEDIEU Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. **Arch. Microbiol.** (1987) 148, 68-71.

Citogenética molecular Molecular Cytogenetics



40 AÑOS DE ACTIVIDAD
EN EL CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS (1968-2008)

40 YEARS OF ACTIVITY AT
THE CIB (1968-2008)

José Luis Díez Cortes
INVESTIGADOR CIENTÍFICO

He estado vinculado al CIB desde 1968, donde realicé mi tesis doctoral en el Departamento de Citología bajo la dirección del Prof. López Sáez. Tras realizar mi formación postdoctoral en el Instituto Max Planck de Tübingen (Alemania), Abt. Beermann, me reincorporé al CIB en 1973. Mi interés científico se ha centrado en el estudio del cromosoma eucariótico utilizando como modelo los cromosomas politénicos de dípteros (*Chironomus*). Particular atención se ha dedicado al estudio de la organización y función de los telómeros de estos organismos, cuya estructura así como su mecanismo de elongación parecen diferir sustancialmente del ampliamente conservado basado en la acción de la telomerasa.

I have been appointed at the CIB from 1968 where I did my doctoral thesis directed by Prof. López-Sáez at the Dept. of Cytology. After a postdoctoral stay at the Max Planck Institut Für Biologie, Abt. Beermann, Tübingen (Germany), I reincorporated to the CIB in 1973. My scientific interest has been focused on the study of the eukaryotic chromosome taking as a model polytene chromosome of dipterans (*Chironomus*). Particular attention was devoted to the study of the organization and function of the telomeres in these organisms, whose structure and its elongation mechanism seem to differ of the widely conserved based on the action of telomerase.

Martínez, J.L., Sánchez-Elsner, T., Morcillo, G., and Díez, J.L. (2001). Heat-shock regulatory elements are present in telomeric repeats of *Chironomus thummi*. **Nucleic Acid Res.** 29(22) 4760-4766.

Díez, J.L., Martínez-Guitarte, J.L., Gorab, E., and Morcillo, G. (2008). Transcriptional Activity at the Telomeres of *Chironomus* (Diptera). Its Possible Role in the Lengthening of the Telomeres. In: *Telomeres: Function, Shortening and Lengthening*. Nova Science Publishers Editors: Leonardo Manzini. In press.

Otro Personal Jubilado | Other Retired Personnel

2007

M^a Teresa Alda López
Ayudante Investigación, 19/02/2007

M^a del Carmen Partearroyo Lacaba
Ayte. Diplomado Investigación, 20/04/2007

José M^a Marcilla Cavanillas
Ayudante Investigación, 25/06/2007

Carlos Almarza Sanz
Técnico Subalt.2^a, 25/12/2007

M^a Soledad Martínez Vara del Rey
Ayte. Diplomado Investigación, 31/12/2007

2008

Pedro José APARICIO ALONSO
Profesor de Investigación, 06/08/2008

Tesis doctorales Ph.D. thesis

2007
2008



Fernando Álvarez Alfageme.

"Efectos potenciales del maíz transgénico (maíz Bt) sobre los depredadores *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae) y *Stethorus punctillum Weise* (Coleoptera: Coccinellidae)".

ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid.
SEPTIEMBRE, 2007.
Director: Pedro Castañera.



Ivett Barany.

"Reprogramación del polen y obtención de plantas doble-haploides en *Capsicum annuum* L: Marcadores celulares y expresión de moléculas señalizadoras y de estrés".

Universidad Complutense de Madrid.
ABRIL, 2008.
Directoras: María del Carmen Risueño y Pilar S. Testillano.



Ángeles Domínguez-Soto.

"Regulación de la expresión y función de las lectinas mieloides DC-SIGN y LSECtin".

Universidad Complutense de Madrid.
ABRIL, 2008.
Director: Angel Corbí López.



Elsa Alverca Moreno.

"Study of the dinoflagellate nuclear organization. Structural and functional aspects". Tesis europea.

Universidad de Lisboa.
MARZO, 2007.
Directora: Susana Moreno Díaz de la Espina.



Raquel Bello Collantes.

"Análisis inmunológico y funcional de la variabilidad de las cadenas CD3ε del complejo TCR/CD3".

Universidad Complutense de Madrid.
MARZO, 2007.
Director: José María Rojo Hernández.



Oier Etxebeste Juárez.

"Nuevos genes involucrados en la inducción de la conidiación de *Aspergillus nidulans*".

Universidad País Vasco.
MAYO, 2008.
Director: Eduardo Espeso.



Donna Amrán Cohen.

"Regulación, ejecución y potenciación de la acción apoptótica de drogas antitumorales con componente metálico (cisplatino y trióxido de arsénico) en células leucémicas mieloides humanas".

Universidad Complutense de Madrid.
JUNIO, 2007. Directores: Patricio Aller Tresguerres y Consuelo Calle García.



Paloma Bragado Domingo.

"Caracterización de la regulación de p53 por p38aMAPK utilizando células deficientes en dicha kinasa".

Universidad Complutense de Madrid.
JUNIO, 2008.
Directores: Augusto Silva González y Almudena Porras.



Javier Fernández Martínez.

"Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*".

Universidad Complutense de Madrid.
ENERO, 2007.
Director: Eduardo Espeso.



David García Bernal.

"Caracterización de la señalización intracelular involucrada en la regulación por quimioquinas de la adhesión dependiente de la integrina α4β1 en linfocitos T".

Universidad Complutense de Madrid.
MARZO, 2007.
Director: Joaquín Teixidó Calvo.



Lidia Araújo Bazán.

"Análisis de las principales rutas de importación y exportación nuclear en *Aspergillus nidulans*".

Universidad Complutense de Madrid.
NOVIEMBRE, 2008.
Director: Eduardo Espeso.



Sara Borniquel Gisbert.

"Estudio de la regulación del Coactivador Transcripcional PGC-1α por Óxido Nítrico en Células Endoteliales".

Universidad Complutense de Madrid.
MAYO, 2007.
Directores: Santiago Lamas y María Monsalve.



África Fernández López.

"Bases Moleculares y Celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, HHT".

Universidad Complutense de Madrid.
ENERO, 2007.
Directores: Carmelo Bernabéu Quirante y Luisa-María Botella Cubells.
"Premio Extraordinario".



María Belén García-Fojeda García-Valdecasas.

"Bases moleculares de la Epilepsia de Lafora. Implicación de los genes responsables en el metabolismo del glucógeno".

Universidad Complutense de Madrid.
JUNIO, 2008.
Director: Santiago Rodríguez de Córdoba.



Ernesto Arias Palomo.

"Análisis Estructural de proteínas reguladoras de GTPasas de la superfamilia Ras mediante microscopía electrónica".

Universidad Complutense de Madrid.
NOVIEMBRE, 2008.
Director: Óscar Llorca.



Eugenia Carrillo Gallego.

"Estudio de la inmunogenicidad de candidatos a vacuna contra leishmaniasis visceral en el modelo canino".

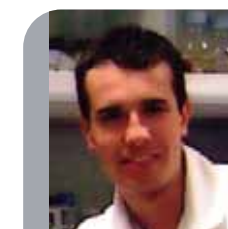
Universidad Complutense de Madrid.
MARZO, 2007.
Directores: Francisco Javier Moreno Nuncio y Jorge Alvar Ezquerro.



María José Fernández Nestosa.

"Desbloqueo de la diferenciación en líneas eritroleucémicas resistentes a los agentes inductores".

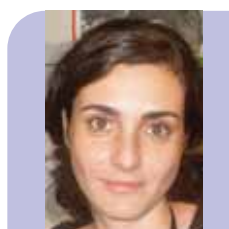
Universidad Complutense de Madrid.
SEPTIEMBRE, 2007.
Directora: Dora Beatriz Krimer Smunis.



Javier Gayarre Navarro.

"Modificación de proteínas por lípidos electrófilos: selectividad e implicaciones biológicas".

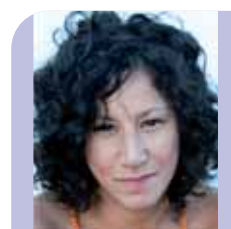
Universidad Complutense de Madrid.
DICIEMBRE, 2007.
Directora: M^a Dolores Pérez-Sala Gozalo.



Jimena Baleriola Gómez de Pablos

"Caracterización del significado funcional de la muerte celular temprana. Proceso de modificación del material genético durante el desarrollo de la retina de ratón".

Universidad Complutense de Madrid.
NOVIEMBRE 2008.
Director: Enrique J. de la Rosa.



Teresa Chavarría Giménez.

"Muerte celular programada de precursores neurales: Caracterización de su incidencia y regulación durante el desarrollo de la retina de vertebrados".

Universidad de Extremadura, Centro Univ. de Plasencia,
OCTUBRE 2007. Directores: Enrique J. de la Rosa y Raquel Mayordomo.



Marta Fierro Fernández.

"Superenrollamiento del DNA y horquillas de replicación en retroceso".

Universidad Complutense de Madrid.
OCTUBRE, 2007.
Director: Bernardo Schwartzman Blinder.



Elena Goicoechea de Jorge.

"Síndrome Hemolítico Urémico. Bases Moleculares y Modelos Animales".

Universidad Autónoma de Madrid.
NOVIEMBRE, 2007.
Director: Santiago Rodríguez de Córdoba.



José Juan Hernández Gay.
"La conformación de glicomiméticos en su estado libre en disolución y asociados a sus receptores. Una visión 3D utilizando RMN".
Universidad Autónoma de Madrid.
JUNIO, 2008.
Directores: Jesús Jiménez Barbero y F. Javier Cañada Vicinay.



Cristina Magaña de Larriva.
Mecanismos de resistencia de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) a insecticidas organofosforados".
ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid.
MAYO, 2007.
Director: Félix Ortego.



Irene Ramos López.
"Evaluación de la respuesta inmune protectora en perros con leishmaniasis visceral".
Universidad Complutense de Madrid.
Director: Vicente Larraga



Carmen Sánchez Las Heras.
"Análisis bioquímico y funcional de la subunidad RYBP de complejos Polycomb".
Universidad Complutense de Madrid.
DICIEMBRE 2007.
Director: Miguel Angel Vidal Caballero.



América Hervás-Aguilar.
"Procesamiento proteolítico del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*".
Universidad Complutense de Madrid.
MARZO, 2007.
Director: M.A. Peñalva.



Iris Mercedes Manosalva Peña.
"Cambios epigenéticos inducidos por el envejecimiento en oocito de ratón".
Universidad Autónoma de Madrid.
ABRIL, 2008.
Director: Pedro Esponda Fernández, Co-directora: Clara Goday Baylina.



Olga Rodríguez Galán.
"Estudios celular y molecular del complejo ESCRT-III de *Aspergillus nidulans* y su relación con la señalización por pH ambiental".
Universidad Complutense de Madrid.
JUNIO, 2008.
Director: Miguél A. Peñalva.



Ignacio del Valle.
"Nuevos marcadores de células madre neurales: expresión selectiva en nichos neurogénicos y función como inhibidores de la proliferación y diferenciación de neuroesferas".
Universidad Autónoma de Madrid.
MARZO, 2008.
Director: Augusto Silva González.



Asier Jayo Andrés.
"Nuevos avances en el conocimiento de la fisiopatología de la plaqueta".
Universidad Complutense de Madrid.
SEPTIEMBRE, 2008.
Directora: Consuelo González Manchón.



Isabel Matía Jurado.
"La organización funcional del nucleolo, la proliferación y el ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Alteraciones inducidas por cambios gravitatorios".
Universidad Autónoma de Madrid.
MARZO, 2008.
Director: Francisco Javier Medina Díaz.



Angel Rivera Calzada.
"Biología estructural de la reparación de roturas de doble cadena en el ADN".
Universidad Complutense de Madrid.
JULIO, 2008.
Director: Óscar Llorca.



Isabel Valles.
"Estudio de los compuestos lipídicos durante la degradación de la madera de eucalipto por diferentes hongos: Transformación de los extraíbles lipofílicos y síntesis de nuevos metabolitos fúngicos".
Universidad Complutense de Madrid.
ENERO 2007.
Directores: A.T. Martínez (CIB, CSIC), A. Gutiérrez (IRNAS, CSIC) y J.C. del Río (IRNAS, CSIC)



Nathalie Levy Guarda.
"Embriogénesis gamética: cultura in vitro di antere e di microspora isolate in alcune piante da frutto mediterranee". Tesis Doctoral Internacional.
Universita degli Studi di Palermo (Italia).
ABRIL, 2007.
Directoras: Pilar S. Testillano y María Antonieta Germana (Univ. Palermo, Italia).



María Moreno del Álamo.
"Un motivo clave en la proteína Orc4p para el ensamblaje del complejo iniciador de la replicación en *S. cerevisiae*".
Universidad Complutense de Madrid.
NOVIEMBRE, 2008.
Director: Rafael Giraldo Suárez.



José Ángel Ruiz Masó.
"Iniciación de la replicación del plásmido promiscuo pMV158: interacciones macromoleculares en el origen de replicación".
Universidad Complutense de Madrid.
SEPTIEMBRE, 2007.
Directora: Gloria del Solar Dongil.



María Pilar López Navajas.
"Interacción de las proteínas de división celular FtsZ y ZipA de *Escherichia coli*: caracterización bioquímica, biofísica y estructural".
Universidad Complutense de Madrid.
MAYO, 2007.
Director: Germán Rivas



Úrsula Muñoz Morón.
"Ciclo celular y fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Relevancia de estudios en células extra neuronales".
Universidad Complutense de Madrid.
MAYO, 2007.
Directora: Ángeles Martín Requero.



Francisco Javier Sánchez Gómez.
"Papel de la modificación covalente de proteínas en los efectos biológicos de la prostaglandina 15-desoxi- Δ 12,14-PGJ2".
Universidad Complutense de Madrid.
JUNIO, 2008.
Directora: M^a Dolores Pérez-Sala Gozalo.



Juan Román Luque Ortega.
"El metabolismo energético de Leishmania como diana de nuevas moléculas leishmanicidas".
Universidad Complutense de Madrid.
MAYO, 2008.
Director: Luis I. Rivas López.



Dina Patricia Pabón Realpe.
"Papel del complejo GPIb-IX en la activación plaquetaria dependiente de trombina y en la diferenciación megacariocítica".
Universidad Autónoma de Madrid.
JULIO, 2008.
Directora: Consuelo González Manchón.



Israel Sánchez Fernández.
"Nuevos compuestos antiangiogénicos derivados de los ácidos del benceno: caracterización estructural".
Universidad Autónoma de Madrid.
JUNIO, 2008.
Directores: Guillermo Giménez-Gallego y Antonio Romero Garrido.

Tesis doctorales
Ph.D. thesis

2007
2008

Premios y Distinciones

Awards and Honors

Pedro Castañera Domínguez	Miembro del grupo de expertos "OGM Non-Target Organisms" de la <i>European Food Safety Authority</i> .
Fernando Díaz	Premio de la Sociedad Española de Proteómica, modalidad de publicación científica, patrocinado por <i>Bruker Bioscience Española S.A.</i> , 2008.
José Luis García	Premio Nacional de Biotecnología Aliter-Merk, 2008.
Jesús Jiménez Barbero	Premio Bruker de RMN de la Real Sociedad Española de Química, 2008.
Santiago Lamas	Premio de la Fundación Renal "Iñigo Alvarez de Toledo" de Investigación Básica, 2007.
Oscar Llorca	Premio de la Fundación Francisco Cobos, edición 2007, "Reconocimiento de la trayectoria investigadora en Biomedicina".
Flora de Pablo	Directora General del Instituto de Salud Carlos III, IX.2007-IX.2008. Académica de la <i>Russian Academy of Nature and Society (Armenian Branch)</i> electa 2008.
María del Carmen Risueño	Presidenta electa de la Sociedad Española de Biología Celular (SEBC). Miembro del Comité de Priorización de Líneas de Programas de la ESA (<i>European Space Agency</i> , Paris) y la NASA (Washington, USA).
Santiago Rodríguez de Córdoba	Premio de la Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo" de Investigación Básica, 2008. <i>Member of the Henry Kunkel Society</i> .
Enrique J. de la Rosa	I Premio a la investigación FUNDALUCE 2008.

Proyectos Especiales

Special Projects

- **Marie Curie Excellence Grant MEXT-CT-2006-042334, (2007-2013).**
"Protein Biophysics: Experimental and Computational Investigations of Folding, Structure, Function, and Design".
Víctor Muñoz.
- **Consolider CSD2007-00005, Ministerio de Ciencia e Innovación, (2008-2012).**
"Diversidad y metagenoma microbiano de la Península Ibérica".
Jose Luis García.
- **Consolider CSD2008-00013 (INTERMODS), Ministerio de Ciencia e Innovación, (2008-2013).**
"Interactivity of plasmid modules and the genomes of bacterial pathogens".
Manuel Espinosa (Coord.), Gloria del Solar, Alicia Bravo.
- **Consolider, Ministerio de Ciencia e Innovación, (2007-2008).**
"Reactive Oxygen Species and Systems (ROSAS)".
Santiago Lamas (Coord.), Eduardo Rial, Patricio Aller.
- **Consolider CD500057, Ministerio de Ciencia e Innovación, (2007-2012).**
"Función y potencial biotecnológico de los factores de transcripción en las plantas" (Transplanta).
Julio Salinas.
- **CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, (2007-2008).**
Roberto Parrilla, Carmelo Bernabeu, Angeles Martín Requero.
- **CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, (2007-2008).**
Ernesto García López.
- **CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, (2008-2010) y nodo de la Red de Diabetes y Metabolismo (REDIMET) (2007).**
Flora de Pablo.
- **Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III RD06/0008/0012 (2007-2009).**
Angel L. Corbí.
- **Red Temática Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (2007-2010).**
Joaquín Teixidó Calvo, M^a de los Ángeles García Pardo y Oscar Llorca.
- **Red Temática Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET), Instituto de Salud Carlos III (2007-2010).**
Vicente Larraga y Luis I. Rivas.
- **Red Comunidad Autónoma de Madrid, BIPEDD CM-bio0214-2006.**
"Bioinformatics Integrative Platform for structure-based drug discovery".
Pablo Chacón, Antonio Romero, Fernando Díaz, Javier Cañada, Jesús Jiménez Barbero, José Manuel Andreu, Oscar Llorca y Rafael Giraldo.
- **Red Comunidad Autónoma de Madrid, S-GEN-0191.**
"Estudio proteómico de la ruta de la ubiquitina para la mejora de plantas de interés agroalimentario (2007-2010)".
Julio Salinas.
- **Red Comunidad Autónoma de Madrid, COMBACT CM-BIO0260-2006.**
"Nuevas dianas para combatir a las bacterias patógenas". (2007-2010).
Manuel Espinosa, Gloria del Solar, Alicia Bravo, Luis Rivas López.

Seminarios del CIB

CIB Seminars

JEFES DEL AULA DE SEMINARIOS:
Augusto Silva (2007), M^a Dolores Pérez-Sala (2008)

REPRESENTANTES DE DEPARTAMENTOS:
José Luis Barbero, Eduardo Espeso,
Consuelo González-Manchón, Oscar Llorca, Teresa Suárez,
José Luis Rodríguez Fernández, y Francisco Tenllado.

SECRETARIA:
M^a Victoria Lafita

2007

Dra. Judith L. Rapoport

Chief Child Psychiatry Branch, National Institute of Mental Health NIH, Bethesda, USA.
"Brain development in healthy, hyperactive and psychotic children"

Douglas R. Green

Doherty Chair of Immunology, Department of Immunology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA.
"Pathways to apoptosis"

Sr. D. Julián de Zulueta

Presidente de la Fundación Giner de los Ríos, Institución Libre de Enseñanza
¿De qué murió Carlos V?

Juan S. Bonifacio, Ph.D.

Chief, Cell Biology and Metabolism Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, USA.
"Mecanismos moleculares de la biogénesis de lisosomas"

Prof. Dr. Francisco Gracia-Navarro

Director, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.
"Las políticas de investigación sanitaria ante los retos y oportunidades de la nueva medicina"

Prof. Víctor Muñoz

Departamento de Ciencia de Proteínas, CIB, CSIC, Madrid.
"Fast protein folding: Living in a world with no barriers"

Prof. Jan Löwe

Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, Hills Road, Cambridge, UK.
"A bacterial dynamin-like protein"

Prof. Dr. R. Benavente

Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter of the University of Würzburg, Würzburg, Germany.
"El cromosoma en la meiosis"

Prof. Dr. Laszlo Bögre

School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Reino Unido.
"Regulation of plant growth, interconnections between cell cycle and growth control"

Dr. Philippe Pasero

Institute of Human Genetics, Montpellier, France.
"Single-molecule analysis of DNA replication and genomic instability in yeast and human cells"

Dra. Vanesa Rawe

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción, Buenos Aires, Argentina.
"Dinámica de los proteasomas en gametos, cigotos y embriones humanos: implicaciones durante la fertilización in vitro"

Prof. Dr. Martin Beye

Evolutionary Genetics, Heinrich-Heine Universitaet Duesseldorf, Institut fuer Genetik, Germany.
"Evolutionary dynamics of sex determination: lessons from the honey bee"

Dr. Zoltan Magyar

School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Reino Unido.
"Arabidopsis E2F transcription factors: coordination of cell growth and cell division?"

Dr. Roberto González-Amaro

Catedrático de Inmunología, Universidad de San Luis Potosí, México.
"Linfocitos T reguladores en enfermedades autoinmunes. Efecto de agentes biológicos y de moléculas inhibitoras"

Guillermo García-Cardeña, Ph.D.

Assistant Professor of Pathology, Harvard Medical School, Center for Excellence in Vascular Biology, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA.
"Control hemodinámico de la función vascular y genes del endotelio"

Prof. Alberto Muñoz

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid.
"Vitamina D, Wnt, Snail y cáncer de colon"

Dr. Jyrki Heino

Department of Biochemistry, University of Turku, Turku, FinITTTand.
"Signalling mechanisms of the integrin-type collagen receptors"

Dr. Hugh Reyburn

MRC, Cambridge, UK.
"Agotamiento y engaño: dos maneras para evadir el sistema inmune innato"

Dr. Jesús Aguirre

Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.
"La transducción de señales de estrés y la diferenciación celular en el hongo Aspergillus nidulans"

Dr. Luis Ángel Fernández

Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC, Madrid.
"Explorando los sistemas de secreción de proteínas de E. coli para la expresión de anticuerpos recombinantes"

Dr. Juan Lema

Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Compostela.
"Reactores enzimáticos para la degradación de compuestos recalitrante"

Dr. Josep Casadesus

Professor of Genetics, Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla.
"Regulación de interacciones DNA-proteína por metilación Dam2"

Dr. Juan Méndez

Jefe de Grupo de Replicación de ADN, CNIO, Madrid.
"Caracterización del complejo GINS, esencial para la replicación del DNA eucariótico"

Peter Kima, PhD.

Associate Professor, Microbiology and Cell Science, University of Florida, USA.
"Cell signaling by the intravacuolar pathogen, Leishmania"

Dr. Juan Fernández Recio

Life Sciences Department, Barcelona Supercomputing Center, Barcelona.
"Predicción y modelado de complejos proteína-proteína: el reto que viene"

Dr. Sebastian Doniach

Profesor of Applied Physics and Physics, Department of Applied Physics, Stanford, CA, USA.
"RNA control of gene expression: structural studies of a riboswitch"

Dr. Federico Gago Badenas

Departamento de Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares.

Dr. Manuel Ferrer

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), CSIC, Madrid.
"Metagenomas como biofactoría de proteínas con nuevas actividades y estructuras"

"Aplicación de herramientas computacionales al estudio de las interacciones entre pequeñas moléculas y macromoléculas biológicas como ADN y proteínas"

Prof. Guillermo Giménez Gallego

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.
"La inhibición del factor de crecimiento para fibroblastos: posibles aplicaciones"

Dra. Mayte Villalva

Dpto. de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
"Alergia a alimentos. La mostaza como modelo de estudio"

Dr. Manuel Echeverría

Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Université de Perpignan/CNRS/IRD, Perpignan, Francia.
"The tsnoRNAs in Arabidopsis and the microRNA in rice"

Dr. John Vontas

Laboratory Pesticide Science, Agricultural University of Athens, Greece.
"The development and application of microarray technology in the analysis of insecticide resistance"

Dr. Manel Esteller

CNIO, Madrid.
"Epigenética, expresión génica y estructura nuclear"

Dr. René Feyereisen

INRA-Université de Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, France.
"Evolution and function of the cytochrome P450 family in insects"

Prof. Nam-Hai Chua

Laboratory of Plant Molecular Biology, Rockefeller University, New York, USA.
"Expression of artificial miRNAs in transgenic plants confers virus resistance and mechanisms of action of viral suppressors"

2008

Dr. Haruhiko Koseki

Developmental Genetics, Riken Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Japan.
"Polycomb bodies in Polycomb function"

Dr. José M^a Ruiz González

Instituto de Neurociencias "Ramón y Cajal", CSIC, Madrid.
"Estudio de la función de SFRP5, modulador de la vía de WNT, durante el desarrollo del ojo en el pez medaka"

Antonio Celada MD PhD.

Professor of Immunology, IRB-PCB, Universitat de Barcelona, Barcelona
"Macrófagos e inflamación: el bueno, el feo y el malo"

Dra. Edurne Berra Ramírez

Parque Tecnológico de Vizcaya, Derio (Vizcaya)
"Fisio-patología de la cascada activada por hipoxia"

Mireia Duñach, PhD.

Dept. Bioquímica i Biologia Molecular (U. Biofísica), Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
"Cateninas: proteínas efectoras de la adhesión celular"

Prof. Federico Mayor Menéndez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
"Interactoma de las quinasas GRKs: Nuevas funciones celulares y fisiológicas"

Dr. Rafael Pulido

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.
"Nuevas fosfatasa de especificidad dual en mamíferos, plantas y levaduras"

Dra. Anna Bigas

Institut Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, Hospitalet, Barcelona.
"Función de Notch en la generación de las células madre hematopoyéticas en el embrión de ratón"

Prof. Edward A. Bayer

Department of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.
"Bioengineering of cellulosomes: Prospects for conversion of biomass to bioenergy"

Dr. Sebastián Albertí

Profesor Titular de la Universidad de Las Islas Baleares, Palma de Mallorca.
"Papel de las células epiteliales en las infecciones bacterianas"

Prof. Sven Panke

ETH Zürich, Institute of Process Engineering, Zürich, Switzerland.
"Towards Orthogonality: Synthetic Biology and Metabolism"

Jacob Piehler, PhD.

Heisenberg Professor of Biochemistry, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Institute of Biochemistry, Biocenter N210, Frankfurt, Alemania.
"Probing complex protein-protein interactions on membranes by multi-parameter solid phase detection"

Prof. Juan Pedro García Ballesta

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (UAM/CSIC) Madrid.
"El ribosoma eucariótico o sobre como la Evolución genera nuevas funciones"

Dr. Manuel Guzmán

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid.
"Cannabinoides como posibles agentes antitumorales"

Prof. Concha Gil

Catedrática de Microbiología, Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.
"Estrategias proteómicas para estudiar la interacción patógeno-hospedador. Identificación de biomarcadores de utilidad en diagnóstico y vacunación"

Dr. William A. Eaton

Laboratory of Chemical Physics, National Institutes of Health, Bethesda, USA.
"Biofísica de la Anemia Falciforme. De las Bases Físicas hasta la Terapia"

Prof. Alessandro Pelizzola

Dipartimento di Fisica and CNISM, INFN Sezione di Torino, Politecnico di Torino, Italia.
"Ising-like model of protein thermal and mechanical (un)folding"

Prof. Liisa Viikari

Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland.
"Enzymes for lignocellulosicbiorefineries"

Prof. Luis Aragón

Cell Cycle Group, MRC Clinical Sciences Centre, Hammersmith Hospital Campus Faculty of Medicine, Imperial College London, UK.
"CDC14 activation silences RNA Polymerase I transcription of ribosomalgenes during anaphase"

Prof. Susan Lindquist

Whitehead Institute-MIT, Cambridge, USA.
"Heat Shock Factor and the balance between neurodegeneration and cancer"

Prof. Sergio Moreno

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC, Salamanca.
"Mecanismos moleculares que regulan la salida del ciclo celular: papel en diferenciación, estabilidad genómica y cáncer"

Prof. David Nicholls

Mitochondrial Dysfunction, Buck Institute for Age Research (USA).
"Quantifying the Mitochondrial Proton Circuit in Intact Cells - Volts and Amps"

Visitantes Especiales Special Visitors

Prof. Mario Rodríguez Pérez. (invitado por Prof. Pedro Castañera).
Profesor Titular del Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México. Sabático (2007 a 2008).

Nina Dinjaski. (invitado por Prof. José Luis García).
Universidad de Novi Sad, Servia. (2007-2008). (Invitado por Prof. Pedro Castañera)

Carlos Sierra Sánchez. (invitado por Prof. José Luis García).
Centro de Tecnologías Físicas, CSIC, Madrid. (2007-2008).

Prof. Francisco Aguilera. (invitado por Dra. Clara Goday).
Universidad de Chile (II-2007).

Prof. María Inés Pigozzi. (invitado por Dra. Clara Goday).
Universidad de Medicina de Buenos Aires, Argentina (VI-2008).

Prof. Alex Patricio Romero Zuñiga. (invitado por Dra. Sara I. Pérez Prieto).
Académico. Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile (V-VI, 2007).

Prof. Celene Salgado Miranda. (invitado por Dra. Sara I. Pérez Prieto).
Centro de Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma de México (VII-VIII, 2007).

Prof. Luisa Fernanda Fanjul. (invitado por Prof. Roberto Parrilla).
Catedrática de Fisiología. Universidad de Las Palmas, Gran Canaria. (2007-2008).

Prof. Consuelo Calle García. (invitado por Dr. Patricio Aller).
Profesora Titular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (2008).

Prof. Mario Saparrat. (invitado por Prof. Angel T. Martínez).
Universidad de la Plata/Investigador del CONICET, Argentina (I-III, 2008).

Prof. Atef Jaouani. (invitado por Prof. Angel T. Martínez).
Universidad de Túnez, Túnez (VI-VII, 2008).

Prof. Antonietta Germana. (invitado por Dra. M. Carmen Risueño).
Dept. SENFIMIZO, Faculty of Agriculture, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia. 2008.

Prof. Ivan Raska. (invitado por Dra. M. Carmen Risueño).
Head of the Department of Cell Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague. 2007.

Prof. Bruno Cattachio. (invitado por Dr. Germán Rivas).
Dept. Biochemica, Universidad de Roma, Italia (I-III, 2007).

Dr. Allen P. Minton. (invitado por Dr. Germán Rivas).
NIH, Bethesda, MD, (XI-XII, 2008).

Dr. Álvaro Ortega. (invitado por Dr. Germán Rivas).
Centre Biochimie Structurale, Montpellier, Francia (II-III, 2008).

Dra. Anna F Digilio. (invitado por Prof. Lucas Sánchez).
Istituto de Genética y Biofísicas "ABT" (C.N.R.), Nápoles, Italia. Sabático (XII-2007 a V-2008).

Dra. Rominy N. Stefani. (invitado por Prof. Lucas Sánchez).
Instituto de Biología, Universidad de Sao Paulo, Brasil (II-2007 a I-2008).

Dr. Juan Fernández Tajés. (invitado por Prof. Lucas Sánchez).
Becado por Xunta de Galicia, programa de Doctores e Investigadores "Ángeles Alvarino" (IV-XII, 2008).

Prof. Cristina de Castro. (invitado por Dr. Jesús Jiménez Barbero).
Universidad de Nápoles, Italia. Sabático (2008-2009).

Jornadas científicas en el CIB CIB Simposia



Jornadas primavera 2007

14 de Junio

Presentación:
Prof. Vicente Larraga

SESIÓN 1 Moderador: Dr. Oscar Llorca

"El control de la eficiencia energética mediante proteínas desacoplantes"
Dr. Eduardo Rial.

"Evolución molecular del gen Sex-lethal"
Dra. M^a Fernanda Ruiz.

"Ensamblaje de nanoestructuras proteicas amiloides asistido por secuencias definidas de DNA"
Dr. Rafael Giraldo.

SESIÓN 2. Moderador: Dr. Francisco Tenllado

"Plantas transgénicas resistentes a insectos: implicaciones ecológicas del cultivo de maíz Bt."
Prof. Pedro Castañera.

"De la retina embrionaria a la posible terapia neuroprotectora: Un camino recorrido en el CIB"
Dr. Enrique de la Rosa.

"Transferencia de genes en gametos animales: consecuencias y enigmas"
Dr. Pedro Esponda.

SESIÓN 3. Moderador: Dr. Augusto Silva

"Dando vueltas en el CIB: De la ultracentrífuga al proto-anillo de división bacteriano"
Dr. Germán Rivas.

"El núcleo esquelito de plantas: algunas proteínas cambian pero no su organización o funcionalidad"
Dra. Susana Moreno.

"La huella genética de la telangiectasia hemorrágica hereditaria, una enfermedad que afecta al sistema de señalización de TGFbeta"
Dra. Luisa Botella.

"Neumococo, un patógeno modelo: de la investigación básica a la clínica"
Dr. Pedro García.

Celebración del 50 aniversario del CIB

Jornadas primavera 2008

29 de Mayo

"El Bacteriófago ø29. De la Biología Molecular a la Biotecnología".
Margarita Salas
Profesora de Investigación del CSIC. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

30 de Mayo

"La innovación, una necesidad en la economía española y europea".
Joaquín Almunia
Comisario de Asuntos Económicos de la Unión Europea.
"Apoptosis, competición celular y cáncer en Drosófila".
Ginés Morata.
Profesor de Investigación del CSIC. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

Simposio organizado por la Fundación Ramón Areces.

Coordinador:
Vicente Larraga
Director del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid

"Los cincuenta años del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC: su impacto en el desarrollo de las Ciencias Biológicas en España".

28 de Octubre

9.15 h Presentación e introducción del simposio
Raimundo Pérez-Hernández y Torra
Director de la Fundación Ramón Areces.
Federico Mayor Zaragoza
Presidente del Consejo Científico. Fundación Ramón Areces.
Vicente Larraga

9.30 h "El CIB y sus dos sedes. Una historia con presente y futuro"
Guillermo Gimenez
Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.

10.00 h "La creación de un centro de Biología moderno: el apoyo de las grandes figuras José María Albareda, Gregorio Marañón y Jesús García Orcyoy. La contribución de Avelino Pérez Geijo"
Julio R. Villanueva
Consejo Científico. Fundación Ramón Areces.

10.30 h "El nacimiento y desarrollo de la bioquímica en España. Las contribuciones de Ángel Santos y Alberto Sols"
Federico Mayor Zaragoza
Consejo Científico. Fundación Ramón Areces.

11.30 h Descanso

12.00 h "La aportación del CIB del CSIC al desarrollo de la Microbiología"
Concepción García Mendoza
Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.

12.30 h "La enzimología, primer paso de la Bioquímica. Las contribuciones de Alberto Sols, Gertrudis de la fuente y Carlos Asensio"
Claudio Fernández Heredia
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC. Madrid.

13.00 h "El CIB como centro precursor de otros centros de Biología"
Jesús Ávila
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.

14.00 h Descanso

16:00 h "El Instituto Ramón y Cajal en el CIB"
José Borrell
Instituto Ramón y Cajal. CSIC. Madrid.

16.30 h "Experiencias y recuerdos del CIB"
Enrique Blázquez
Universidad Complutense Madrid

17:00 h "El Rector Santiago Gascón y su labor universitaria"
Fernando Moreno y Amparo García Ochoa
Universidad de Oviedo

17.30 h "La evolución de Biología Molecular desde los años 60"
Margarita Salas
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.

18.00 h "Contribuciones de David Vázquez a la investigación en antibióticos"
Juan Pedro García Ballesta
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.
Julio R. Villanueva
Fundación Ramón Areces.

18:30 h "El desarrollo de la Microbiología en Salamanca y Madrid"
Ángel Durán
Instituto de Microbiología-Bioquímica. CSIC. Universidad de Salamanca.
César Nombela
Departamento de Microbiología Universidad Complutense. Madrid.

29 de Octubre

9.30 h "La diáspora hacia las Universidades: Salamanca, Sevilla, Oviedo, Valencia y al CBMSO de la Universidad Autónoma"

Rafael Santandreu
Universidad de Valencia

10.00 h "Del CIB al CNIO: un nuevo modelo de gestión científica en España"
Mariano Barbacid
Director CNIO, Madrid

10.30 h "La evolución de la bioquímica vegetal en la universidad de Sevilla"
Manuel Losada Villasante
Universidad de Sevilla

11.00 h "El CIB y la Genética del desarrollo en España"
Antonio Gracia Belido y Ginés Morata
Centro de biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.

11.30 h "La Endocrinología: una ciencia que inició la transversalidad hacia la clínica en los años 70: el impulso de Gabriela Morreale y Francisco Escobar"
Emilio Herrera
Universidad San Pablo CEU. Boadilla del Monte. Madrid.

12.00 h Descanso

12.30 h "El CIB, una mirada diferente: investigación básica y transferencia de tecnología"
Flora de Pablo y Enrique J. de la Rosa
CIB. Madrid.

13.00 h "Desarrollo fisiológico del ciclo celular"
Gonzalo Gimenez Martín y Consuelo de la Torre
Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.

13.30 h "El desarrollo científico español en la década de los sesenta y años posteriores"
Emilio Muñoz Ruiz
Ex-Presidente del CSIC. Madrid.

14.00 h "El CIB ante la nueva situación de la ciencia española. Un futuro esperanzador"
Vicente Larraga

Bibliografía Publications

Primeros artículos por Factor de Impacto SCI | Top articles by Impact Factor SCI



2007

1. Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., Gimenez-Gallego, G., Sanchez, P.C., Fowler, D.M., Koulou, A., Kelly, J.W., Mothes, W., Grivel, J.C., Margolis, L., Keppler, O.T., Forssmann, W.G., and Kirchhoff, F. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. **Cell** 131(6):1059-1071.

2. Enríquez, J.A., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Movilla, N., Gallardo, M.E., De Córdoba, S.R., Pérez-Martos, A., and Fernández-Silva, P. (2007). Reactive oxygen species and the segregation of mtDNA sequence variants - reply. **Nature Genetics** 39(5): 572-572.

3. Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. **Nature Cell Biology** 9(12):1428-1435.

4. Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L.S., Jordi, V.S., Fojeda, B.G., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medrano-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., De Córdoba, S.R., and Guinovart, J.J. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. **Nature Neuroscience** 10(11): 1407-1413.

5. Pickering, M.C., de Jorge, E.G., Martínez-Barricarte, R., Recalde, S., García-Layana, A., Rose, K.L., Moss, J., Walport, M.J., Cook, H.T., de Córdoba, S.R., and Botto, M. (2007). Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. **Journal of Experimental Medicine** 204(6): 1249-1256.

6. Adami, A., García-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., and Llorca, O. (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. **Molecular Cell** 27(3):509-516.

7. Buey, R.M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M.C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D., Day, B.W., Sorensen, E.J., Lopez, J.A., Andreu, J.M., Hamel, E., and Diaz, J.F. (2007). Cyclosporin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. **Nature Chemical Biology** 3(2): 117-125.

8. Llorca, O. (2007). Electron microscopy reconstructions of DNA repair complexes. **Current Opinion in Structural Biology** 17(2): 215-220.

9. Genis, L., Gonzalo, P., Tutor, A.S., Galvez, B.G., Martínez-Ruiz, A., Zaragoza, C., Lamas, S., Tryggvason, K., Apte, S.S., and Arroyo, A.G. (2007). Functional interplay between endothelial nitric oxide synthase and membrane type 1-matrix metalloproteinase in migrating endothelial cells. **Blood** 110(8): 2916-2923.

10. Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L., and Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(34): 13774-13779.

11. de Jorge, E.G., Harris, C.L., Esparza-Gordillo, J., Carreras, L., Arranz, E.A., Garrido, C.A., Lopez-Trascasa, M., Sanchez-Corral, P., Morgan, B.P., and de Córdoba, S.R. (2007). Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(1): 240-245.

12. Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D.B., Stasiak, A., and Schwartzman, J.B. (2007). Topological locking restrains replication fork reversal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(5): 1500-1505.

13. Giraldo, R. (2007). Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(44): 17388-17393.

14. Novillo, F., Medina, J., and Salinas, J. (2007). Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(52): 21002-21007.

15. Santillana, E., Beceiro, A., Bou, G., and Romero, A. (2007). Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(13): 5354-5359.

16. Rivera-Calzada, A., Spagnolo, L., Pearl, L.H., and Llorca, O. (2007). Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. **MBO Reports** 8(1): 56-62.

17. Sanchez, C., Sanchez, I., Demmers, J.A.A., Rodriguez, P., Strouboulis, J., and Vidal, M. (2007). Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx10/Jhd1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. **Molecular & Cellular Proteomics** 6(5): 820-834.

18. Fernandez-Lopez, A., Garrido-Martin, E.M., Sanz-Rodriguez, F., Pericacho, M., Rodriguez-Barbero, A., Eleno, N., Lopez-Novoa, J.M., Duwell, A., Vega, M.A., Bernabeu, C., and Botella, L.M. (2007). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Human Molecular Genetics** 16(13): 1515-1533.

19. Ruiz-Perez, V.L., Blair, H.J., Rodriguez-Andres, M.E., Blanco, M.J., Wilson, A., Liu, Y.N., Miles, C., Peters, H., and Goodship, J.A. (2007). Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. **Development** 134(16): 2903-2912.

20. Corzana, F., Busto, J.H., Jimenez-Oses, G., de Luis, M.G., Asensio, J.L., Jimenez-Barbero, J., Peregrina, J.M., and Avenoza, A. (2007). Serine versus threonine glycosylation: The methyl group causes a drastic alteration on the carbohydrate orientation and on the surrounding water shell. **Journal of the American Chemical Society** 129(30): 9458-9467.

21. Corzana, F., Cuesta, I., Freire, F., Revuelta, J., Torrado, M., Bastida, A., Jimenez-Barbero, J., and Asensio, J.L. (2007). The pattern of distribution of amino groups modulates the structure and dynamics of natural aminoglycosides: Implications for RNA recognition. **Journal of the American Chemical Society** 129(10): 2849-2865.

22. Kover, K.E., Groves, P., Jimenez-Barbero, J., and Batta, G. (2007). Molecular recognition and screening using a N-15 group selective STD NMR method. **Journal of the American Chemical Society** 129(37): 11579-11582.

23. Terrano, G., Potenza, D., Canales, A., Jimenez-Barbero, J., Baldrige, K.K., and Bernardi, A. (2007). A simple model system for the study of carbohydrate-aromatic interactions. **Journal of the American Chemical Society** 129(10): 2890-2900.

24. Valdeolmillos, A.M., Viera, A., Page, J., Prieto, I., Santos, J.L., Parra, M.T., Heck, M.M.S., Martinez, C., Barbero, J.L., Suja, J.A., and Rufas, J.S. (2007). Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. **Plos Genetics** 3(2): 204-215.

25. Perez-Gomez, E., Villa-Morales, M., Santos, J., Fernandez-Piqueras, J., Gamallo, C., Dotor, J., Bernabeu, C., and Quintanilla, M. (2007). A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. **Cancer Research** 67(21): 10268-10277.

26. Prieto, A., Leal, J.A., Gimenez-Abian, M.I., Canales, A., Jimenez-Barbero, J., and Bernabeu, M. (2007). Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofuranose from the cell wall of the fungus *Acrospermum compressum*. **Glycoconjugate Journal** 24(8): 421-428.

27. Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzymatics. **Current Opinion in Microbiology** 10(5): 461-472.

28. Smith, R.H., Alexander, J., Barlow, P.N., Botto, M., Cassavant, T.L., Cook, H.T., de Córdoba, S.R., Hageman, G.S., Jokiranta, T.S., Kimberling, W.J., Lambris, J.D., Lanning, L.D., Levidiotis, V., Licht, C., Lutz, H.U., Meri, S., Pickering, M.C., Quigg, R.J., Rops, A.L., Salant, D.J., Sethi, S., Thurman, J.M., Tully, H.F., Tully, S.P., van der Vlag, J., Walker, P.D., Wurznner, R., and Zipfel, P.F. (2007). New approaches to the treatment of dense deposit disease. **Journal of the American Society of Nephrology** 18(9): 2447-2456.

29. Bernreiter, A., Ramon, A., Fernandez-Martinez, J., Berger, H., Araujo-Bazan, L., Espeso, E.A., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Ander, I., Scazzocchio, C., and Strauss, J. (2007). Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology** 27(3): 791-802.

30. Galindo, A., Hervas-Aguilar, A., Rodriguez-Galan, O., Vincent, O., Arst, H.N., Tilburn, J., and Penalva, M.A. (2007). PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. **Traffic** 8(10): 1346-1364.

31. Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., and Saez-Vasquez, J. (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in *Arabidopsis*. **Molecular Biology of the Cell** 18(2): 369-379.

32. Saunders, R.E., Garrido, C.A., Fremaux-Bacchi, V., de Jorge, E.G., Goodship, T.H.J., Trascasa, M.L., Noris, M., Castro, I.M.P., Remuzzi, G., de Córdoba, S.R., Corral, P.S., Skerka, C., Zipfel, P.F., and Perkins, S.J. (2007). The interactive factor H-atypical hemolytic uremic syndrome mutation database and website: Update and integration of membrane cofactor protein and factor I mutations with structural models. **Human Mutation** 28(3): 222-234.

33. Castanares, C., Redondo-Horcajo, M., Magan-Marchal, N., ten Dijke, P., Lamas, S., and Rodriguez-Pascual, F. (2007). Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. **Journal of Cell Science** 120(7): 1256-1266.

34. Chuchana, P., Marchand, D., Nugoli, M., Rodriguez, C., Molinari, N., and Garcia-Sanz, J.A. (2007). An adaptation of the LMS method to determine expression variations in profiling data. **Nucleic Acids Research** 35(9).

35. Monti, M.C., Hernandez-Arriaga, A.M., Kamphuis, M.B., Lopez-Villarejo, J., Heck, A.J.R., Boelens, R., Diaz-Orejas, R., and van den Heuvel, R.H.H. (2007). Interactions of kid-kis toxin-antitoxin complexes with the parD operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of kid-kis oligomers. **Nucleic Acids Research** 35(5): 1737-1749.

36. Ruiz-Maso, J.A., Lurz, R., Espinosa, M., and del Solar, G. (2007). Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication. **Nucleic Acids Research** 35(4): 1230-1244.

37. Serrano-Heras, G., Ruiz-Maso, J.A., del Solar, G., Espinosa, M., Bravo, A., and Salas, M. (2007). Protein p56 from the *Bacillus subtilis* phage phi 29 inhibits DNA-binding ability of uracil-DNA glycosylase. **Nucleic Acids Research** 35(16): 5393-5401.

38. Torreira, E., Schoehn, G., Fernandez, Y., Jorba, N., Ruigrok, R.W.H., Cusack, S., Ortin, J., and Llorca, O. (2007). Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. **Nucleic Acids Research** 35(11): 3774-3783.

39. Diaz-Guerra, E., Vernal, R., del Prete, M.J., Silva, A., and Garcia-Sanz, J.A. (2007). CCL2 inhibits the apoptosis program induced by growth factor deprivation, rescuing functional T cells. **Journal of Immunology** 179(11): 7352-7357.

40. Andreu, V., Collados, R., Testillano, P.S., Risueno, M.D., Picorel, R., and Alfonso, M. (2007). In situ molecular identification of the plastid omega 3 fatty acid desaturase FAD7 from soybean: Evidence of thylakoid membrane localization. **Plant Physiology** 145(4): 1336-1344.

41. Lamas, S., Lowenstein, C.J., and Michel, T. (2007). Nitric oxide signaling comes of age: 20 years and thriving. **Cardiovascular Research** 75(2): 207-209.

42. Martínez-Ruiz, A. and Lamas, S. (2007). Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. **Cardiovascular Research** 75(2): 220-228.

43. Bello, R., Feito, M.J., Ojeda, G., Portoles, P., and Rojo, J.M. (2007). Loss of N-terminal charged residues of mouse CD3 epsilon chains generates isoforms modulating antigen T cell receptor-mediated signals and T cell receptor-CD3 interactions. **Journal of Biological Chemistry** 282(31): 22324-22334.

44. de Eugenio, L.I., Garcia, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., San Roman, J., Garcia, J.L., and Prieto, M.A. (2007). Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442 - Characterization of a paradigmatic enzyme. **Journal of Biological Chemistry** 282(7): 4951-4962.

45. Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2007). Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. **Journal of Biological Chemistry** 282(25): 18190-18196.

46. Hervas-Aguilar, A., Rodriguez, J.M., Tilburn, J., Arst, H.N., and Penalva, M.A. (2007). Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. **Journal of Biological Chemistry** 282(48): 34735-34747.

47. Huecas, S., Schaffner-Barbero, C., Garcia, W., Yebenes, H., Palacios, J.M., Diaz, J.F., Menendez, M., and Andreu, J.M. (2007). The interactions of cell division protein FtsZ with guanine Nucleotides. **Journal of Biological Chemistry** 282(52): 37515-37528.

48. Martínez-Moreno, M., Martínez-Ruiz, A., Alvarez-Barrientos, A., Gavilanes, F., Lamas, S., and Rodríguez-Crespo, I. (2007). Nitric oxide down-regulates caveolin-3 levels through the interaction with myogenin, its transcription factor. **Journal of Biological Chemistry** 282(32): 23044-23054.

49. Muñoz-Espin, D., Fuertes, M.A., Jimenez, M., Villar, L., Alonso, C., Rivas, G., Salas, M., and Meijer, W.J.J. (2007). Structural and functional analysis of phi 29 p16. 7C dimerization mutants - Identification of a novel aromatic cage dimerization motif. **Journal of Biological Chemistry** 282(22): 16521-16531.

50. Perez-Dorado, I., Campillo, N.E., Monterroso, B., Heseck, D., Lee, M., Paez, J.A., Garcia, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., Mobashery, S., Menendez, M., and Hermoso, J.A. (2007). Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. **Journal of Biological Chemistry** 282(34): 24990-24999.

51. Romero, P., Lopez, R., and García, E. (2007). Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Biological Chemistry** 282(24): 17729-17737.

Bibliografía cont. Publications cont.'d



2008

1. Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O., and Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. **Nature** 455(24): 124-U93.

2. Wei, C., Moeller, C.C., Altintas, M.M., Li, J., Schwarz, K., Zacchigna, S., Xie, L., Henger, A., Schmid, H., Rastaldi, M.P., Cowan, P., Kretzler, M., Parrilla, R., Bendayan, S., Gupta, V., Nikolic, B., Kalluri, R., Carmeliet, P., Mundel, P., and Reiser, J. (2008). Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. **Nature Medicine** 14(21): 55-63.

3. Zhou, H.X., Rivas, G.N., and Minton, A.P. (2008). Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. **Annual Review of Biophysics** 37(5): 375-397.

4. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., and Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews** 21(6): 334-359.

5. Vazquez-Quinones, L., Hernandez, E.T., de Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J.L., Suja, J.A., and Pendas, A.M. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. **Genes & Development** 22(20): 2400-2413.

6. Schuermann, J.P., Jiang, J.W., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L.P., Jiménez, L.E., Jin, S.P., Taylor, A.B., Demeler, B., Morano, K.A., Hart, P.J., Valpuesta, J.M., Lafer, E.M., Sousa, R. (2008). Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. **Molecular Cell** 31(2): 232-243.

7. Redondo-Munoz, J., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2008). Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. **Blood** 111: 383-386.

8. Redondo-Munoz, J., Ugarte-Berzal, E., Garcia-Marco, J.A., del Cerro, M.H., Van den Steen, P.E., Opendakker, G., Terol, M.J., and Garcia-Pardo, A. (2008). alpha 4 beta 1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. **Blood** 112(1): 169-178.

9. Purschwitz, J., Mueller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., and Fischer, R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. **Current Biology** 18(4): 255-259.

10. Schapire, A. L., Voigt, B., Jasik, J., Rosado, A., Lopez-Cobollo, R., Menzel, D., Salinas, J., Mancuso, S., Valpuesta, V., Baluska, F., Botella, M.A. (2008). Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. **Plant Cell** 20(12): 3374-3388.

11. Blanco, F.J., Grand E, M.T., Langa, C., Oujou, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Lopez-Novoa, J.M., and Bernabeu, C. (2008). S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. **Circulation Research** 103(12): 1383-U91.

12. Ferrer, M., Golyshina, O.V., Beloqui, A., Boettger, L.H., Andreu, J.M., Polaina, J., De Lacey, A.L., Trautwein, A.X., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2008). A purple acidophilic di-ferric DNA ligase from *Ferroplasma*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(26): 8878-8883.

13. Halskau, O., Perez-Jimenez, R., Ibarra-Molero, B., Underhaug, J., Muñoz, V., Martínez, A., and Sanchez-Ruiz, J.M. (2008). Large-scale modulation of thermodynamic protein folding barriers linked to electrostatics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(25): 8625-8630.

14. Jimenez, J.I., Canales, A., Jimenez-Barbero, J., Ginalski, K., Rychlewski, L., Garcia, J.L., and Diaz, E. (2008). Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: The nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(32): 11329-11334.

15. Orejas, R.D. (2008). Editorial From the Chief Editor. **Fems Microbiology Reviews** 32(2): 1-1.

16. Mellen, M.A., de la Rosa, E.J., and Boya, P. (2008). The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. **Cell Death and Differentiation** 15(8): 1279-1290.

17. Fung, A., Li, P., Godoy-Ruiz, R., Sanchez-Ruiz, J.M., and Muñoz, V. (2008). Expanding the realm of ultrafast protein folding: gpW, a midsize natural single-domain with alpha+beta topology that folds downhill. **Journal of the American Chemical Society** 130(23): 7489-7495.

18. Revuelta, J., Vacas, T., Torrado, M., Corzana, F., Gonzalez, C., Jimenez-Barbero, J., Menendez, M., Bastida, A., and Asensio, J.L. (2008). NMR-based analysis of aminoglycoside recognition by the resistance enzyme ANT(4[']): The pattern of OH/NH3+ substitution determines the preferred antibiotic binding mode and is critical for drug inactivation. **Journal of the American Chemical Society** 130(15): 5086-5103.

19. Zhang, Z.Q., McCallum, S.A., Xie, J., Nieto, L., Corzana, F., Jimenez-Barbero, J., Chen, M., Liu, J., and Linhardt, R.J. (2008). Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. **Journal of the American Chemical Society** 130(39): 12998-13007.

20. Solaz-Fuster, M.C., Gimeno-Alcaniz, J.V., Ros, S., Fernández-Sánchez, M.E., García-Fojeda, B., García, O.C., Vilchez, D., Domínguez, J., García-Rocha, M., Sánchez-Pirís, M., Aguado, C., Knecht, E., Serratos, J., Guinovart, J.J., Sanz, P., and De Cordoba, S.R. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. **Human Molecular Genetics** 17(5): 667-678.

21. Bartolome, R.A., Wright, N., Molina-Ortiz, I., Sanchez-Luque, F.J., and Teixido, J. (2008). Activated G alpha(13) Impairs Cell Invasiveness through p190RhoGAP-Mediated Inhibition of RhoA Activity. **Cancer Research** 68(20): 8221-8230.

22. Penalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends in Microbiology** 16(6): 291-300.

23. Navarro-Gonzalez, J.F. and Mora-Fernández, C. (2008). The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology** 19(3): 433-442.

24. Gasset-Rosa, F., Mate, M.J., Davila-Fajardo, C., Bravo, J., and Giraldo, R. (2008). Binding of sulphonated indigo derivatives to RepA-WH1 inhibits DNA-induced protein amyloidogenesis. **Nucleic Acids Research** 36(7): 2249-2256.

25. Luque-Ortega, J.R., van't Hof, W., Veerman, E.C.I., Saugar, J.M., and Rivas, L. (2008). Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. **FASEB Journal** 22(6): 1817-1828.

26. Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., De Pablo, F., and Zardoya, R. (2008). Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. **Molecular Biology and Evolution** 25(6): 1043-1053.

27. Rodríguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M., Magan-Marchal, N., Lagares, D., Martínez-Ruiz, A., Kleinert, H., and Lamas, S. (2008). Glycerolaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Regulates Endothelin-1 Expression by a Novel, Redox-Sensitive Mechanism Involving mRNA Stability. **Molecular and Cellular Biology** 28(23): 7139-7155.

28. Calses, C., Roman-Trufero, M., Pavon, L., Serrano, I., Melgar, T., Endoh, M., Perez, C., Koseki, H., and Vidal, M. (2008). Inactivation of the polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated with Ink4a deletion. **Molecular and Cellular Biology** 28(3): 1018-1028.

29. Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A. F. and Ferrando, A. (2008). Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating Abscisic acid levels in response to low temperature. **Plant Physiology** 148: 1094-1105.

30. Seguí-Simarro, J.M., Coronado, M.J., and Staehelin, L.A. (2008). The Mitochondrial Cycle of Arabidopsis Shoot Apical Meristem and Leaf Primordium Meristematic Cells Is Defined by a Perinuclear Tentaculate/Cage-Like Mitochondrion. **Plant Physiology** 148(3): 1380-1393.

31. Rial, E. (2008). Cyanide and uncoupling protein function. **Cardiovascular Research** 78(1): 197-197.

32. Santibanez, J.F., Blanco, F.J., Garrido-Martin, E.M., Sanz-Rodríguez, F., del Pozo, M.A., and Bernabeu, C. (2008). Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. **Cardiovascular Research** 77(4): 791-799.

33. Lappchen, T., Pinas, V.A., Hartog, A.F., Koomen, G.J., Schaffner-Barbero, C., and Reu, J.M., Trambaiolo, D., Lowe, J., Juhem, A., Popov, A.V., and Den Blaauwen, T. (2008). Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. **Chemistry & Biology** 15(2): 189-199.

34. Munoz, U., Bartolome, F., Bermejo, F., and Martin-Requero, A. (2008). Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor P27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. **Neurobiology of Aging** 29(10): 1474-1484.

35. Palazuelos, J., Davoust, N., Julien, B., Hatterer, E., Aguado, T., Mechoulam, R., Benito, C., Romero, J., Silva, A., Guzman, M., Nataf, S., and Galve-Roperh, I. (2008). The CB2 cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking. **Journal of Biological Chemistry** 283(19): 13320-13329.

36. Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernández-Alonso, M.C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B., and Hirsch, J.A. (2008). The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. **Journal of Biological Chemistry** 283(9): 5815-5830.

37. Serrano-Gomez, D., Sierra-Filardi, E., Martínez-Núñez, R.T., Caparros, E., Delgado, R., Muñoz-Fernández, M.A., Abad, M.A., Jimenez-Barbero, J., Leal, M., and Corbi, A.L. (2008). Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. **Journal of Biological Chemistry** 283(7): 3889-3903.

38. Mayan-Santos, M.D., Martínez-Robles, M.L., Hernandez Ez, P., Schwartzman, J.B., and Krimer, D.B. (2008). A redundancy of processes that cause replication fork stalling enhances recombination at two distinct sites in yeast rDNA. **Molecular Microbiology** 69(2): 361-375.

39. Gasset-Rosa, F., Diaz-Lopez, T., Lurz, R., Prieto, A., Fernández-Tresguerres, M.E., and Giraldo, R. (2008). Negative regulation of pPS10 plasmid replication: origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. **Molecular Microbiology** 68(3): 560-572.

40. Araujo-Bazan, L., Penalva, M.A., and Espeso, E.A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology** 67(4): 891-905.

41. Baleriola, J., Garcia-Feijoo, J., Martínez-de-la-Casa, J.M., Fernández-Cruz, A., de la Rosa, E.J., and Fernández-Durango, R. (2008). Apoptosis in the trabecular

meshwork of glaucomatous patients. **Molecular Vision** 14 (179-81): 1513-1516.

42. Marcelo, F., Jimenez-Barbero, J., Marrot, J., Rauter, A.P., Sinay, P., and Blieriot, Y. (2008). Stereochemical Assignment and First Synthesis of the Core of Miharaymycin Antibiotics. **Chemistry-a European Journal** 14(32): 10066-10073.

43. Canales, A., Matesanz, R., Gardner, N.M., and Reu, J.M., Paterson, I., Diaz, J.F., and Jimenez-Barbero, J. (2008). The bound conformation of microtubule-stabilizing agents: NMR insights into the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. **Chemistry-a European Journal** 14(25): 7557-7569.

44. Vand Enbussche, S., Diaz, D., Fernández-Alonso, M.C., Pan, W.D., Vincent, S.P., Cuevas, G., Canada, F.J., Jimenez-Barbero, J., and Bartik, K. (2008). Aromatic-carbohydrate interactions: An NMR and computational study of model systems. **Chemistry-a European Journal** 14(25): 7570-7578.

45. Loaliza, O.A., Campuzano, S., Pedrero, M., Pividori, M.I., Garcia, P., and Pingarron, J.M. (2008). Disposable Magnetic DNA Sensors for the Determination of the Attomolar Level of a Specific Enterobacteriaceae Family Gene. **Analytical Chemistry** 80(21): 8239-8245.

46. Munoz, U., Bartolome, F., Esteras, N., Bermejo-Pareja, F., and Martin-Requero, A. (2008). On the mechanism of inhibition of p27 degradation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin In J(2) in lymphoblasts of Alzheimer's disease patients. **Cellular and Molecular Life Sciences** 65(21): 3507-3519.

47. Delgado, M., Perez-Miguelsanz, J., Garrido, F., Rodriguez-Tarduchy, G., Perez-Sala, D., and Pajares, M.A. (2008). Early effects of copper accumulation on methionine metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences** 65(13): 2080-2090.

48. Llorca, O. (2008). Extended and bent conformations of the mannose receptor family. **Cellular and Molecular Life Sciences** 65(9): 1302-1310.

49. Torreira, E., Jha, S., Lopez-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacon, P., Canas, C., Ayora, S., Dutta, A., and Llorca, O. (2008). Architecture of the Pontin/Reptin Complex, Essential in the Assembly of Several Macromolecular Complexes. **Structure** 16(10): 1511-1520.

50. Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D., and Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. **Environmental Microbiology** 10(7): 1690-1702.

51. Blazquez, B., Carmona, M., Garcia, J.L., and Diaz, E. (2008). Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp CIB. **Environmental Microbiology** 19(2): 474-482.

Spin-offs

ProRetina



Tel. 91 - 837 31 12
Ext. 4402

ProRetina Therapeutics S. L. es una Empresa de Base Tecnológica fundada en julio de 2007, como *spin-off* del CIB (CSIC), con la misión de desarrollar terapias para el tratamiento de distrofías de la retina.

PATENT: PCT/ES2007/070097
Use of proinsulin for the preparation of a neuroprotective pharmaceutical composition, therapeutic composition containing it and applications thereof.

EMA & FDA designation as orphan medicinal product.

En colaboración con:



Participantes del Lab. 3D del CIB:

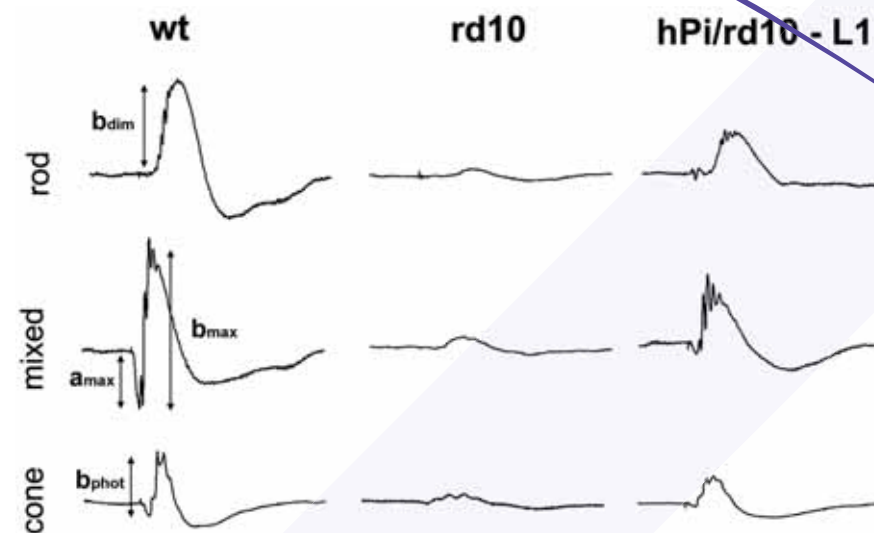
Enrique J. de la Rosa
Flora de Pablo
Teresa Suárez
Patricia Boya
Catalina Hernández
Carolina Iseigas

Administrador Unico:

Stuart Medina

Cols.:

Fátima Bosch y Pedro de la Villa



Electrorretinogramas en ratón silvestre, rd10 y transgénico con proinsulina elevada.

Secugen



www.secugen.es
Tel. 91 - 804 49 05

SECUGEN es una empresa biotecnológica española especializada en la secuenciación automática del DNA y en el análisis genético aplicado a cualquier disciplina relacionada con las Ciencias de la Vida.

Secugen SL se constituye en 2005 gracias al impulso de los Profesores de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Santiago Rodríguez de Córdoba y José Luis García López, como una *spin-off* del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Para su creación también cuenta con el apoyo de dos empresas asociadas: SADNA S.L. y NT GLOBAL S.L.

Hoy ya contamos con más de 600 clientes entre los que se encuentran tanto empresas privadas como Centros públicos de Investigación, Hospitales y Universidades. Además, en consonancia con nuestra filosofía de innovación, estamos participando de forma activa en diferentes proyectos de investigación y desarrollando nuevas plataformas que permitan optimizar la tecnología y avanzar en el conocimiento existente.



Servicio Técnico y Personal Servicios Generales

Technical Service and General Facilities Personnel



Personal del Servicio | Staff:

García Álvarez, Antonio M. J.	Jefe/Head
Angulo Zapatero, José Manuel	INF.
Arranz Bombin, Ángel	M.I.
Atienza Guerrero, Ángel	E.I.
Ayuda Pascual, Alejandro	D.M.
Cabañas Olivares, José	M.I.
España Lara, Jorge	E.I.
Fontenla Lago, Mónica M ^a	F.
García Herranz, Diego	M.I.
García Lacoba, Mario	INF
Guerrero Rivero, Ángel	M.I.
Hurtado Caro, Aurelio	D.M.
Jalon Rico, Pablo	F.
Pérez Pardo, Antonio	M.I.
Pop Marin	M.I.
Tijero Paramo, Juan Miguel	E.I.
Toro Monsalve, Ramon Manuel	INF
Velasco de la Roca, M ^a Paloma	JF-AD

La Unidad de Servicios Técnicos e Infraestructuras esta formada por un equipo multidisciplinar de carácter eminentemente técnico cuyas funciones van encaminadas al desarrollo y buen funcionamiento de las instalaciones y equipos, así como el soporte especializado a los distintos grupos de investigación y servicios del Centro de Investigaciones Biológicas en las materias que son de su competencia; asume también tareas relacionadas con el mantenimiento de algunas infraestructuras del campus del CSIC en la Ciudad Universitaria-Moncloa de Madrid, (comunicaciones informáticas, central de control de accesos).

La unidad de Servicio Técnico es responsable administrativo y en algunos casos del control de uso y soporte a usuarios finales de los equipos de uso general no asignados a otros servicios. Están integrados en ella:

- Servicio de Diseño y Mecánica. (D.M.)
- Servicio de Electrónica e Instrumentación. (E.I.)
- Servicio de Fotografía. (F)
- Servicio de Informática. (INF)
- Servicio de Mantenimiento e Instalaciones. (M.I.)

La coordinación y gestión administrativa se realiza a través de la Jefatura y Administración de Servicios Técnicos e Infraestructuras. (JF-AD)

The Technical Services and Infrastructures Unit, consists of a multidisciplinary team eminently technical in nature whose functions are directed towards the development and satisfactory operation of the facilities and equipment. This unit also offers specialized support to the different research groups and services of the CIB, in matters that are within its scope, also undertaking tasks related to the maintenance of some infrastructures of the CSIC campus in the University Campus of Moncloa-Madrid, (computer science communications, access control centre).

The Service unit has an administrative responsibility and in some cases controls equipment use as well as giving support to end users of general equipment not assigned to other Services. It includes:

- Computer science service. (INF.)
- Design and Mechanical service. (D.M.)
- Electronics and Instrumentation service. (E.I.)
- Maintenance and Facilities service. (M.I.)
- Photography service. (F)

Coordination and management is carried out in conjunction with the head office and administration of the Technical Services and Infrastructures unit. (JF-AD)

Servicios Prestados | Services Offered:

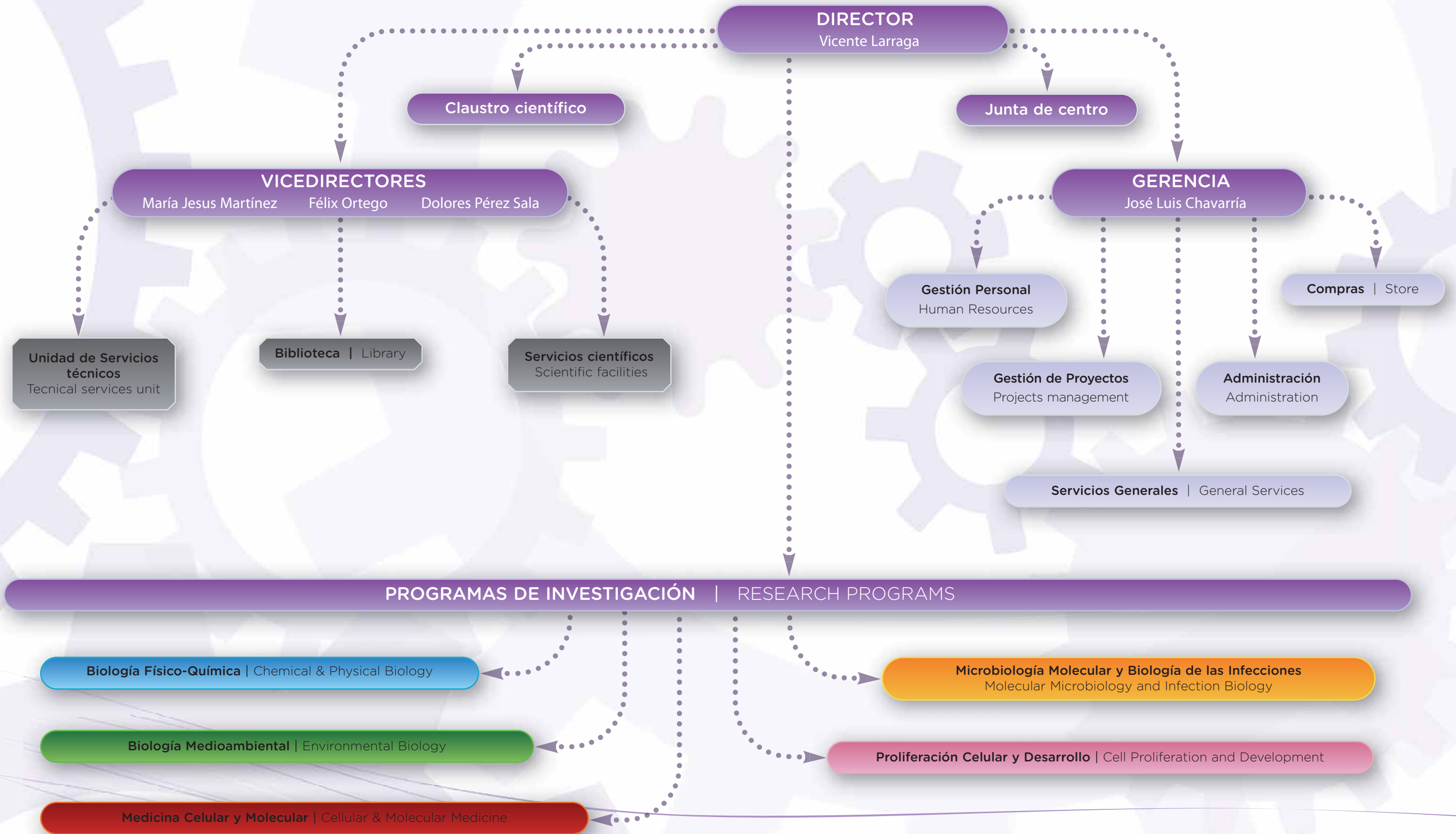
Gestión técnica de concursos públicos; Gestión de las comunicaciones telefónicas; Control técnico de empresas externas que realicen trabajos en el CIB; Asesoramiento Técnico; Biocomputación: Soporte de sistemas y proyectos de usuarios.

Gestión del servidor Web; Soporte de software a usuarios; Soporte a usuarios de Hardware y software de red; Soporte a usuarios de correo electrónico; Gestión de servidores; Soporte de Salas multimedia y Salón de actos; Tratamiento digital de imagen; Realización de tomas fotográficas; Reparación, limpieza y calibración de pipetas automáticas; Realización de posters, gráficos y planos; Gestión residuos tóxicos; Mantenimiento de maquinas reveladoras; Adecuación de laboratorios; Mantenimiento preventivo y correctivo de equipos frigoríficos; Diseño y realización de prototipos, actualización de equipos; Mecanizado de piezas; Mantenimiento y reparación de hardware de equipos informáticos; Revisión de equipos de rayos X; Mantenimiento preventivo y correctivo de sistemas autónomos de climatización e invernadero; Mantenimiento de obra civil; Mantenimiento de instalaciones de fluidos; Jardinería; Reparación de equipamiento básico de laboratorio; Mantenimiento de cuadros eléctricos; Administración de Comunicaciones y electrónica de red; Reparación y calibrado de equipamiento especializado de laboratorio; Mantenimiento preventivo y correctivo del sistema de vigilancia y control de accesos.

Technical management of public tenders; Management of telephone communications; Technical supervision of external companies that work in the CIB; Technical advice; Microcomputing software user support; Biocomputing facilities: System support & user's projects.

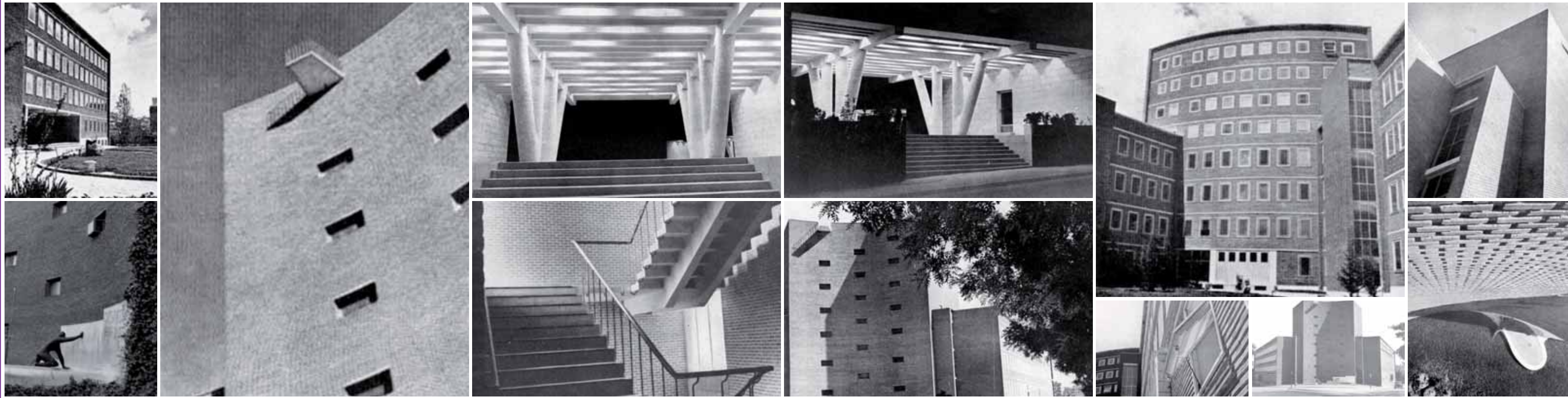
Web server management; Hardware and software network user support; Support to E-mail users; Server Management; Servicing multimedia lecture rooms and Assembly hall; Image Digitalization; Use of photographic techniques; Repair, cleaning and calibration of automatic pipettes; Preparation of posters, graphs and plans; Toxic waste management; Maintenance of developers; Adaptation of laboratories; Preventive and corrective maintenance of refrigerating equipment; Designing and making prototypes, up-dating equipment; Machining of pieces; Maintenance and repair of computer hardware; Checking x-ray equipment; Preventive and corrective maintenance of the independent systems for the air conditioning and greenhouse; Civil work maintenance; Maintenance of installations for fluids; Gardening; Repair of basic laboratory equipment; Maintenance of electrical switchboards; Administration of Communications and Network Electronics; Repairing and calibrating specialized laboratory equipment; Preventive and corrective maintenance of the access monitoring and control system.

Organigrama CIB Structure



Edificios: Velázquez - Ramiro de Maeztu

Old building - new building



Localización CIB

Location CIB



CIB-Centro de Investigaciones Biológicas
Ramiro de Maetzu 9
28040 Madrid
Spain



+34 91 837 31 12



+34 91 536 04 32

Línea 6 de Metro: Estación de Metropolitano | Underground line 6: Metropolitano Station

EMT Madrid | Bus Lines 132, F, C1 y C2

Ciudad Universitaria | University Campus



Memoria científica CIB 2007-2008 | Scientific Report 2007-2008

Coordinación de la edición | Report Coordinators:
Flora de Pablo, Julio Salinas, Oscar Llorca y M^a Victoria Lafita

Fotografía científica | Scientific Photos:
Investigadores/as de los grupos y servicios del CIB | Members of the CIB

Fotografía de personal y edificios | Photography of personnel and other images:
Servicio de fotografía del CIB | CIB Photography Unit (Mónica Fontela y Pablo Jalón)

Diseño gráfico y editorial | Editorial design:
Arte, Comunicación e Ideas
www.aci.es
91 4784711

Madrid
D.L.: M-XXXXXXXXX