

XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Barcelona, del 5 al 8 de septiembre de 2011

SEBBM
BCN2011



Primera edición: Septiembre 2011

© los autores, 2011

XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Publica: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)

Producción editorial: Rubes Editorial, S.L.

Girona 36. 08010 Barcelona

Depósito legal: B-30848-2011

Impreso en España – *Printed in Spain*

Impreso por Comgrafic

Índice

Agradecimientos	5
Comité organizador	6
Junta Directiva de la SEBBM	7
Socios protectores de la SEBBM	7
Agenda diaria	9
Planos del Congreso	11
Expositores	17
Programación diaria	19
Programa científico	22
Conferencias plenarias	22
Simposios	24
Reuniones de grupos	28
Actividades satélites	43
Bioquímica en la ciudad	43
Foro del Emprendedor	44
Curso de Iniciación a la Investigación en Bioquímica y Biología Molecular	46
Mesa redonda L'Oréal/AMIT	47
Mesa redonda sobre divulgación científica	48
Resúmenes	
Conferencias plenarias	49
Conferencia Inaugural Fundación Ramón Areces	51
Conferencia Plenaria Simposio 1	51
Conferencia Plenaria L'Oréal	51
Conferencia Plenaria Simposio 2	52
Conferencia Plenaria H. Niemeyer	52
Conferencia Premio Promega Biotech Ibérica	52
Conferencia Premio Promega Biotech Ibérica (Accésit)	53
Conferencia Plenaria Simposio 3	53
Conferencia Plenaria L. Leloir-PABMB	54
Conferencia Premio Izasa-Werfen	54
Conferencia Plenaria Alberto Sols-Fundación BBVA	55
Simposios	
Simposio 1: Bioquímica y biología molecular del cáncer	57
S1.1. Alteraciones en la señalización celular y cáncer	59
S1.2. Supresores tumorales y oncogenes	60

S1.3. Diferenciación celular en el cáncer	62
Simposio 2: Señalización celular	63
S2.1. Señalización y fisiología de la célula	65
S2.2. Señalización celular y desarrollo	66
S2.3. Señalización y regulación genómica	67
Simposio 3: El universo de las proteínas: estructura y función.	69
S3.1. Análisis estructural, dinámica y acción de proteínas (SIMPOSIO HISPANO-LUSO)	71
S3.2. El universo de las proteínas a través de la genómica, proteómica y bioinformática	72
S3.3. Topografía proteica a nivel celular y tisular	74
Reuniones de grupo	77
R01. Grupo Apoptosis	79
R02. Grupo Bases Moleculares de la Patología	82
R03. Grupo Biología del Desarrollo	84
R04. Grupo Biología Molecular Teórica	86
R05. Grupo Biomembranas y Bioenergética	88
R06. Grupo Bioquímica de la Nutrición	91
R07. Grupo Bioquímica Perinatal.	95
R08. Grupo Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.	97
R09. Grupo Enseñanza de la Bioquímica	101
R10. Grupo Regulación Metabólica	104
R11. Grupo Biotecnología Molecular	107
R12. Grupo Genómica y Proteómica	110
R13. Grupo Metabolismo del Nitrógeno.	112
R14. Grupo Neuroquímica	118
R15. Grupo Parasitología Molecular	120
R16. Grupo Radicales Libres y Estrés Oxidativo	122
R17. Grupo Estructura y Función de las Proteínas	127
R18. Grupo Señalización Celular.	130
R19. Grupo Transgénesis en Mamíferos	132
R20. Grupo Transportadores de Membrana	135
Pósters	139
P01. Grupo Apoptosis	141
P02. Grupo Bases Moleculares de la Patología.	145
P03. Grupo Biología del Desarrollo	164
P04. Grupo Biología Molecular Teórica	168
P05. Grupo Biomembranas y Bioenergética	168
P06. Grupo Bioquímica de la Nutrición	172
P07. Grupo Bioquímica Perinatal.	174
P08. Grupo Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.	177
P10. Grupo Regulación Metabólica	185
P11. Grupo Biotecnología Molecular	197
P12. Grupo Genómica y Proteómica	203
P13. Grupo Metabolismo del Nitrógeno	209
P14. Grupo Neuroquímica	214
P15. Grupo Parasitología Molecular	219
P16. Grupo Radicales Libres y Estrés Oxidativo	225
P17. Grupo Estructura y Función de las Proteínas	231
P18. Grupo Señalización Celular.	254
P19. Grupo Transgénesis en Mamíferos	283
P20. Grupo Transportadores de Membrana.	284
P21. Grupo Regulación de la Expresión Génica y Dinámica del Genoma	286
P. Otros	300
Índice de autores.	313

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a las entidades públicas y privadas que han colaborado económicamente en la realización del XXXIV Congreso de la SEBBM.

Universitat Autònoma de Barcelona
Universitat de Barcelona
Ministerio de Ciencia e Innovación
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
BioCat
Expoquimia

Fundación BBVA
Fundación Ramón Areces
L'Oréal
PABMB
Izasa-Werfen
Promega
Bruker
Fundación Lilly
European Association for Cancer Research (EACR)
ASEBIO
Fundación Genoma España
Eppendorf
Roche
Bio-Rad
Sociedad Española de Biotecnología (SEBiot)
Mercats de Barcelona - Ajuntament de Barcelona

Agilent Technologies
Bio-Rad
Durviz
Ecogen
Fisher Scientific
Illumina
INB
Isogen
IUBMB-FEBS 2012
LabClinics
Laboratorios Conda
Lonza

Merck Millipore
Operon
Panreac Química
Perkin Elmer
Progenika
Protein Alternatives
Sarsted
Sigma
Stab Vida
Thermo Scientific
Vitro

Comité organizador

El XXXIV Congreso de la SEBBM está organizado por la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).

Comité organizador

Presidente: **Joaquín Ariño**
(Universitat Autònoma de Barcelona, UAB)

Vicepresidenta: **Montserrat Pagés**
(Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC)

Secretario: **Diego Haro**
(Universitat de Barcelona, UB)

Tesorera: **Anna Bassols**
(Universitat Autònoma de Barcelona, UAB)

Vocales del Comité organizador

(por orden alfabético):

Rosa Aligué (UB) ⁽¹⁾
F. Xavier Avilés (UAB)
Anna Barcelo (UAB)
Carme Caelles (UB-IRB)
Antonio Casamayor (UAB)
Mireia Duñach (UAB) ⁽²⁾
José Miguel Lizcano (UAB)
Francesc Posas (UPF)
Luis Ruiz (Janus Developments) ⁽³⁾
Joan Seoane (VHIO-UAB)

(1) Responsable de la organización de la **Bioquímica en la ciudad**.

(2) Responsable de la organización del curso de **Iniciación a la Investigación en Bioquímica y Biología Molecular**.

(3) Responsable de la organización del curso **Foro de Emprendedores**.

Junta Directiva de la SEBBM

Presidente:	Miguel Ángel de la Rosa Acosta (2008-2012)
Vicepresidenta:	Alicia Alonso Izquierdo (2010-2014) [Relaciones exteriores y COSCE]
Secretaria:	Isabel Varela Nieto (2010-2014) (Divulgación)
Tesorera:	Carmen Castresana Fernández (2008-2012)
Vocales:	Jerónimo Bravo Sicilia (2008-2012) [Página web]
	Francesc Posas Garriga (2008-2012) [Jóvenes investigadores]
	Arantxa Tabernero Urbieto (2008-2012) [Congresos y cursos]
	Marta Cascante Serratosa (2010-2014) [Cónsules]
	Enrique de la Rosa Cano (2010-2014) [Grupos Científicos]
	Juan Luis Ramos Martín (2010-2014) [Empresa y Patrocinadores]
	Presidente Electo: Federico Mayor Menéndez (2010-2012)

Socios protectores de la SEBBM

Los Socios protectores de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) contribuyen al progreso de la ciencia.





LightCycler®

Size: Reduced. Fun: Amplified.
The new LightCycler® Nano System



For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.

LIGHTCYCLER is a trademark of Roche.

Agenda diaria

Horario	5 de Septiembre	6 de Septiembre	7 de Septiembre	8 de Septiembre
9-10		1.- Entrega de Documentación 2.- Reunión Junta Directiva SEBBM 3.- Colocación de Posters	SIMPOSIO S1.2	SIMPOSIO S1.3
10-11		ACTO INAUGURAL	CONFERENCIA PLENARIA S2	CONFERENCIA PLENARIA S3
11-12	Curso de Iniciación a la Investigación en BBM	CONFERENCIA INAUGURAL (F. R. Ateces)	CAFÉ Y VISITA A PÓSTERSEXPOSICIÓN COMERCIAL	CAFÉ Y VISITA A PÓSTERSEXPOSICIÓN COMERCIAL
12-13	Foro del Emprendedor (Torre Werfen)	CONFERENCIA PLENARIA S1	CONFERENCIA NIEMEYER (45 MIN)	CONFERENCIA LELOIR-PABMB (45 MIN)
13-14		INAUGURACIÓN EXPOSICIÓN COMERCIAL Mesa redonda sobre divulgación científica	PREMIO PROMEGA (30 MIN) ACCESIT PROMEGA (20 MIN)	PREMIO IZASA WERFEN (45 MIN)
14-15	Comida	Comida	Comida	Comida
15-16				
16-17		SIMPOSIO S1.1	REUNIONES DE GRUPOS	REUNIONES DE GRUPOS
17-18	Curso de Iniciación a la Investigación en BBM	SIMPOSIO S2.1 SIMPOSIO S3.1 Hispano-Luso		
18-19	Foro del Emprendedor (Torre Werfen)	CONFERENCIA L'OREAL	POSTER PARTY	POSTER PARTY
19-20		MESA REDONDA L'OREAL-AMYT "La evaluación de la actividad científica"	ASAMBLEA GENERAL SEBBM	CONF. CLAUSURA A. SOLS-FBBVA
20-21	Concesión Premio Provetto Emprendedor			ENTREGA DE PREMIOS Y CLAUSURA
21-22		RECEPCIÓN DE BIENVENIDA (Edificio Histórico de la UB)	ACTO SOCIAL (Palau de la Música Catalana)	CENA DE CLAUSURA (Casa de Convalescència)
22-				



In touch with life

Eppendorf se fundó en Hamburgo, Alemania en el año 1945, con el objetivo de desarrollar, producir y distribuir sistemas innovadores y aportar soluciones a los laboratorios de investigación y rutina en el área de las Ciencias de la Vida. Hoy en día cuenta con más de 2.500 empleados en todo el mundo, que tienen el objetivo de transmitir la misión de la empresa desde sus orígenes:

Mejorar las condiciones de vida del ser humano.

En 2007 Eppendorf adquirió New Brunswick Scientific con la misma filosofía, incorporando al catálogo ultrancongeladores, incubadores, agitadores y equipamiento para fermentación, con la misma calidad a la que nuestros clientes están acostumbrados.

Así completamos nuestro oferta de productos y soluciones para el laboratorio de hoy en día.

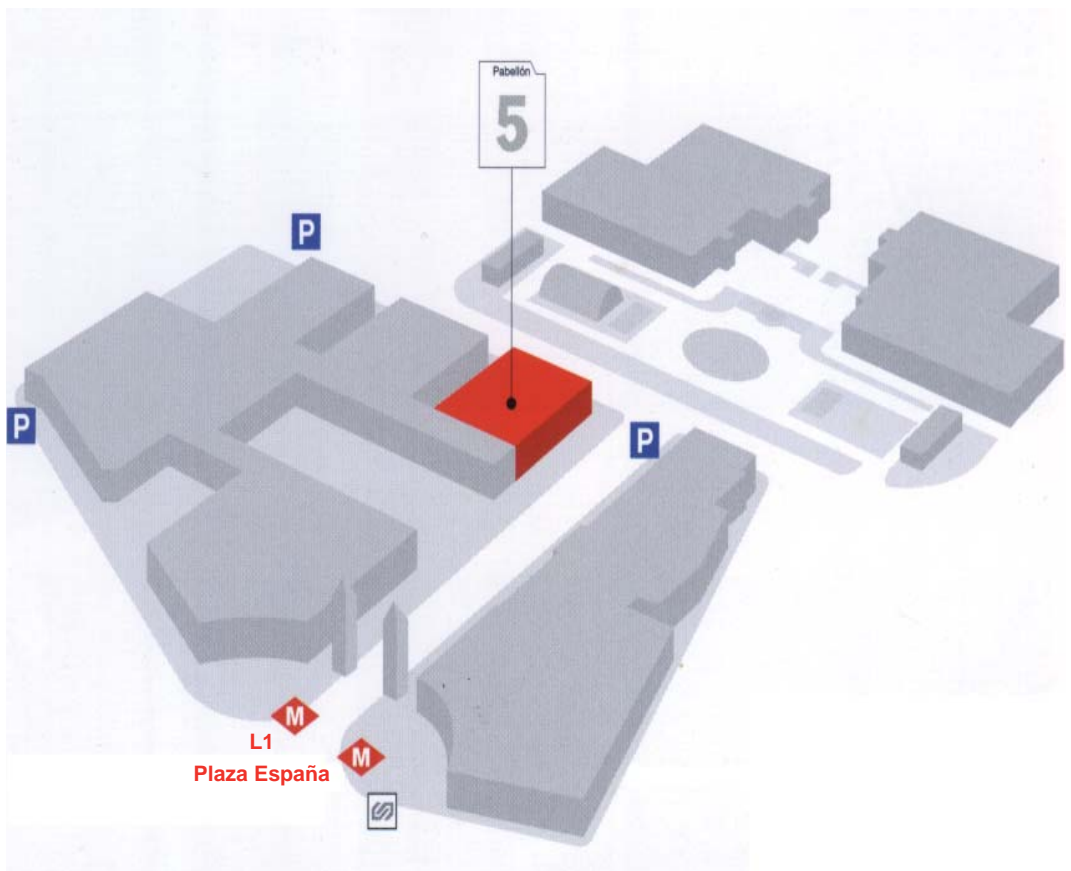
Más información en
www.eppendorf.es

eppendorf
In touch with life

Planos del Congreso

Fira de Barcelona
Recinto Montjuïc
Palacio de Congresos de Barcelona (pabellón 5)
Av. Reina Maria Cristina s/n
08004 - Barcelona

Palacio de Congresos de Barcelona



electrophoreasy.

Resultados Express

Sus geles SDS-PAGE en 15 minutos

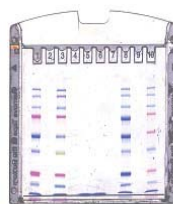
Nuestros nuevos geles preparados Mini-Protean TGX, no solo tienen un año de caducidad y le permiten trabajar con tampones Laemmli, sino que además, le permitirán acelerar el flujo de trabajo de su laboratorio. La química TGX hace que baje la resistencia de los geles, permitiéndole correrlos a 400V. Podrá tener sus resultados en **11-14 minutos, sin perder resolución y sin sobrecalentamiento del tampón,**

Compruébelo usted mismo en nuestro stand, en **20 minutos** haremos electroforesis, visualizaremos y analizaremos muestras con el sistema Mini-PROTEAN TGX Stain Free.

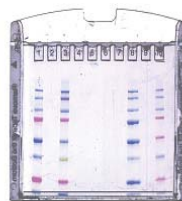
Le ayudamos a conseguir tiempo para analizar sus resultados. Visite nuestra página web www.miniprotean.com si necesita información

Research. Together.

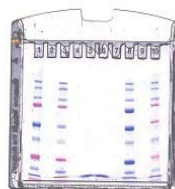
10% Mini-PROTEAN TGX Precast Gels



200 V - 37 minutos



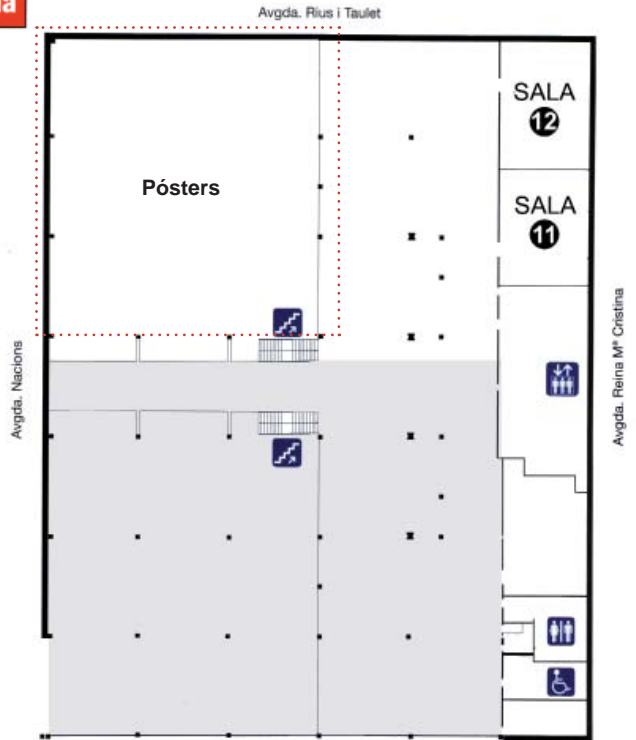
300 V - 22 minutos



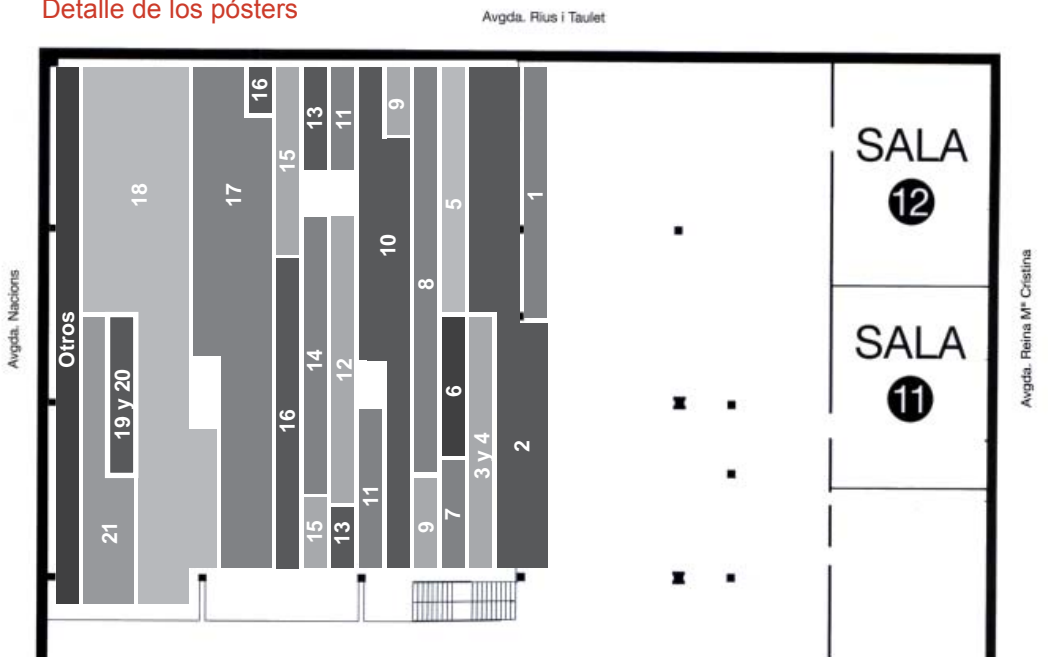
400 V - 12 minutos

Palacio de Congresos de Barcelona

Nivel **0** Pósters

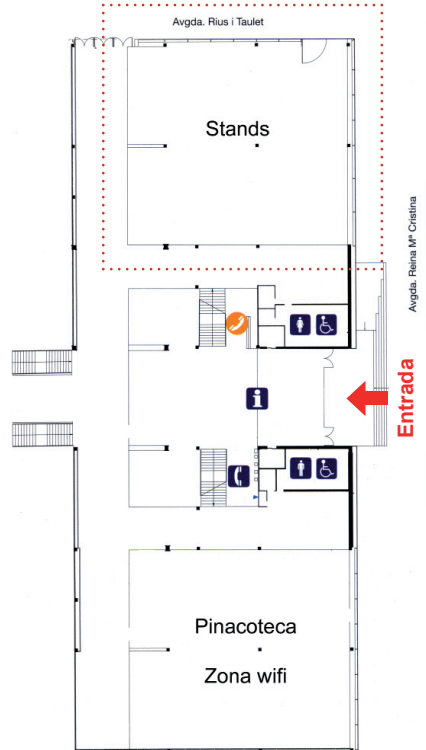


Detalle de los pósters

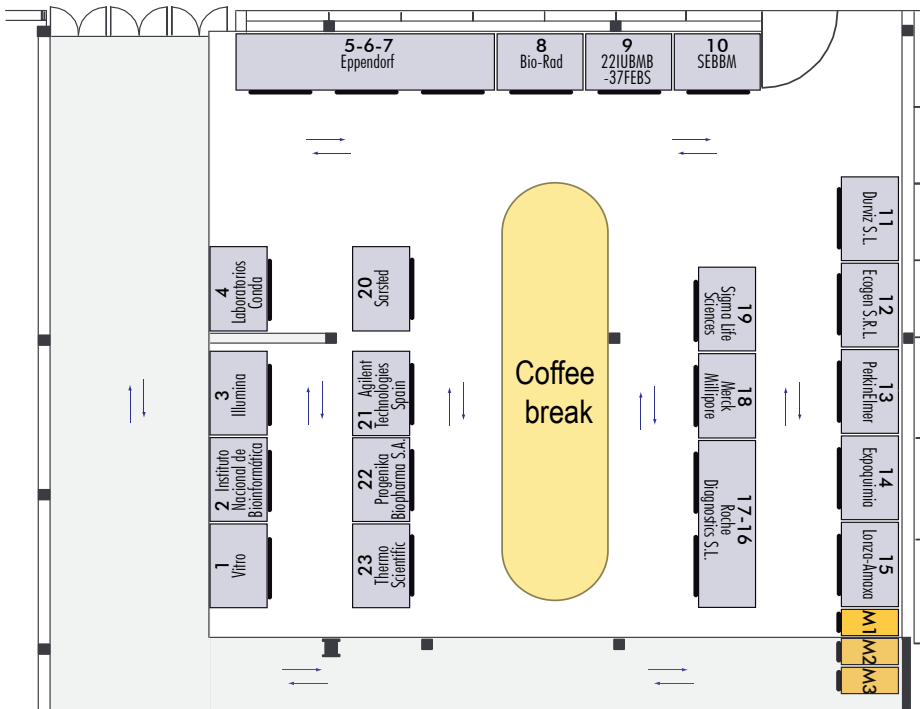


Palacio de Congresos de Barcelona

Nivel 1 Stands

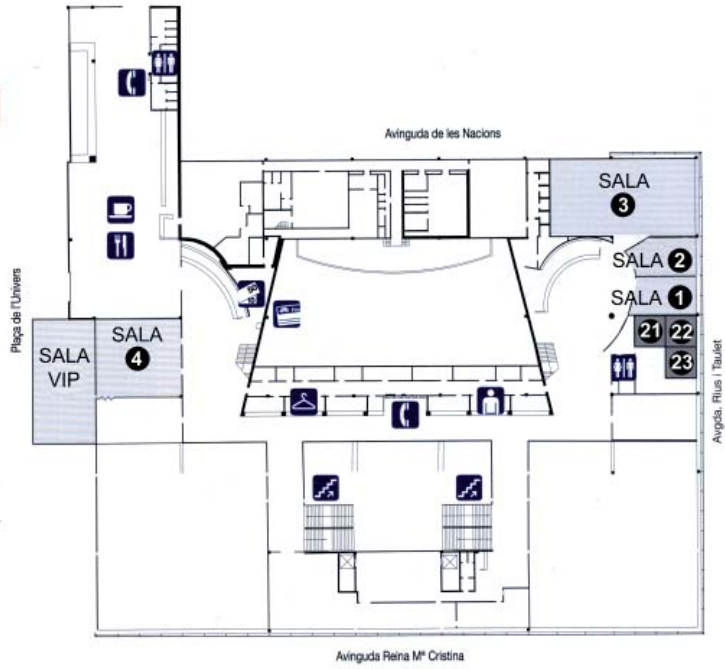


Detalle de los stands



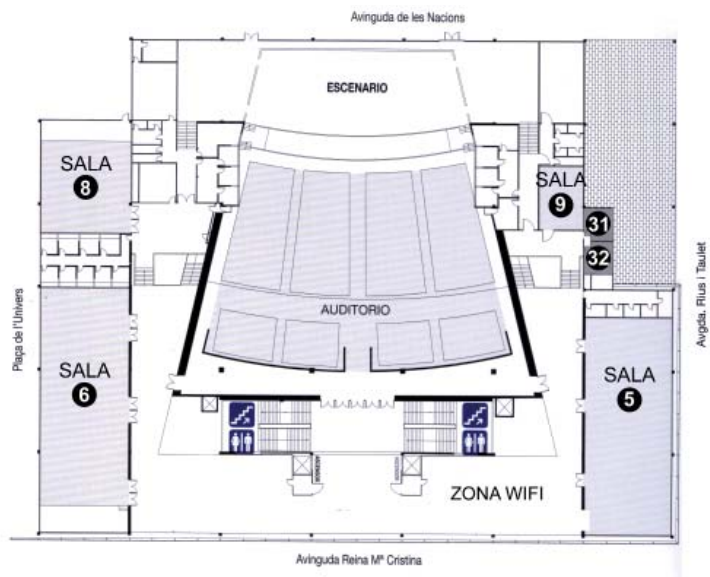
Palacio de Congresos de Barcelona

Nivel **2**



Palacio de Congresos de Barcelona

Nivel **3**
Salas Foyer





Llenamos el mundo de colores. *Colouring the world with Iberia.*

Iberia le ofrece cerca de 900 destinos en 146 países, con las mejores conexiones, gracias a la alianza **oneworld**. Dispone de la flota más moderna de Europa con 180 aviones y 20.671 profesionales dispuestos a prestarle toda la atención y el servicio que usted se merece. Todo pensado para que, vuele donde vuele, su elección sea siempre Iberia.

*Iberia offers you almost 900 destinations in 150 countries, with the best connections, thanks to the **oneworld** alliance. It has the most modern fleet in Europe, with 180 aircrafts and 20.671 professionals ready to give you all the attention and service that you deserve, in the hope that regardless of where you fly your first choice will always be Iberia.*

IBERIA
plus

Gane puntos para volar gratis. Dése de alta en **iberia.com**
Earn points to fly for free. Sign up on **iberia.com**



IBERIA
iberia.com

Expositores

Stands	N.º
Agilent Technologies	21
Bio-Rad	8
Durviz	11
Ecogen	12
Eppendorf	5-6-7
Expoquimia	14
Illumina	3
Instituto Nacional de Bioinformática (INB)	2
22IUBMB - 37FEBS 2012	9
Laboratorios Conda	4
Lonza-Amaxa	15
Merck Millipore	18
Perkin Elmer	13
Progenika	22
Roche	16-17
Sarsted	20
SEBBM	10
Sigma Life Sciences	19
Thermo Scientific	23
Vitro	1

Mostradores

Isogen	M3
Protein Alternatives	M1
Stab Vida	M2

Programación diaria

Lunes 5 de septiembre

08:30-09:00	Entrega de documentación
09:00-14:00	Curso de Iniciación a la Investigación en Bioquímica y Biología Molecular
09:00-14:00	Jornada Foro de Emprendedores en Torre Werfen
10:30-14:00	Reunión de los Coordinadores de grados de Bioquímica y Biotecnología
14:00-15:30	Almuerzo
15:30-19:00	Curso de Iniciación a la Investigación en Bioquímica y Biología Molecular
15:30-20:15	Jornada Foro de Emprendedores Al final se concederá el II Premio Proyecto Emprendedor en Biotecnología (ASEBIO, Genoma España, SEBBM)
16:00-19:00	Reunión de los Coordinadores de grados de Bioquímica y Biotecnología

Martes 6 de septiembre

09:00-11:00	Entrega de documentación y colocación de pósters
09:00-11:00	Reunión de la Junta Directiva de la SEBBM
11:00-11:30	Acto inaugural
11:30-12:15	CONFERENCIA INAUGURAL FUNDACIÓN RAMÓN ARECES <i>Sir Philip Cohen</i> (MRC, Dundee, UK)
12:15-13:00	CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 1 <i>Richard Marais</i> (Cancer Research UK, Londres)
13:00-13:30	Inauguración de la Zona de Expositores
13:30-14:15	Mesa Redonda sobre Divulgación científica
14:15-16:00	Almuerzo
16:00-18:00	Simposio 1: Bioquímica y biología molecular del cáncer S1.1 Alteraciones en la señalización celular y cáncer
	Simposio 2: Señalización celular S2.1 Señalización y fisiología de la célula
	Simposio 3: El universo de las proteínas: estructura y función S3.1 Análisis estructural, dinámica y acción de proteínas (Simposio Hispano-Luso)

- 18:00-18:45 CONFERENCIA PLENARIA L'ORÉAL
Elisa Izaurralde (Max Planck Institute, Tübingen)
- 18:45-19:45 Mesa Redonda L'ORÉAL/AMIT
La evaluación de la actividad científica
- 20:30-22:00 Acto social y recepción de bienvenida en el Edificio Histórico de la
Universidad de Barcelona

Miércoles 7 de septiembre

- 09:00-10:30 **Simposio 1: Bioquímica y biología molecular del cáncer**
S1.2 Supresores tumorales y oncogenes
Simposio 2: Señalización celular
S2.2 Señalización celular y desarrollo
Simposio 3: El universo de las proteínas: estructura y función
S3.2 El universo de las proteínas a través de la genómica, proteómica
y bioinformática
- 10:30-11:15 CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 2
Michael N. Hall (Biozentrum, Basilea)
- 11:15-12:15 Break Seminar Agilent Technologies (Sala 8)
- 11:15-12:15 Café, visita a paneles, visita a expositores
- 12:15-13:00 CONFERENCIA PLENARIA H. NIEMEYER
Martín Montecino Leonard (CIB, Universidad Andrés Bello, Santiago de
Chile)
- 13:00-13:30 CONFERENCIA PROMEGA BIOTECH IBÉRICA
Sergi Regot (Universitat Pompeu Fabra-CEXS, Barcelona)
- 13:30-13:50 CONFERENCIA ACCÉSIT PROMEGA BIOTECH IBÉRICA
María Moriel Carretero (Universidad de Salamanca)
- 13:50-15:30 Almuerzo
- 15:30-18:00 REUNIONES DE GRUPOS (Sesiones simultáneas, consultar detalle)
- 18:00-19:30 Póster Party
- 18:30-20:30 ASAMBLEA GENERAL DE LA SEBBM
- 19:00-20:30 Actividad Satélite LA BIOQUÍMICA EN LA CIUDAD
La modificación genética de plantas y animales. Usos y debates
Lugar: Aula Magna de la Facultad de Medicina, Universidad de
Barcelona (c/ Casanova, 143. Barcelona)
- 21:00-23:00 Actividad social. Concierto en el Palau de la Música

Jueves 8 de septiembre

- 09:00-10:30 **Simposio 1: Bioquímica y biología molecular del cáncer**
 S1.3 Diferenciación celular en el cáncer
 Entrega del Premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer
- Simposio 2: Señalización celular**
 S2.3 Señalización y regulación genómica
- Simposio 3: El universo de las proteínas: estructura y función**
 S3.3 Topografía proteica a nivel celular y tisular
- 10:30-11:15 CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 3
Luis Serrano (CRG, Barcelona)
- 11:15-12:15 Café, visita a paneles, visita a expositores
- 12:15-13:00 CONFERENCIA PLENARIA L. LELOIR-PABMB
Hugo D. Luján (Universidad Católica de Córdoba, Argentina)
- 13:00-13:45 CONFERENCIA PREMIO IZASA-WERFEN
Susana Rodríguez-Navarro (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)
- 13:45-15:30 Almuerzo
- 15:30-18:00 REUNIONES DE GRUPOS (Sesiones simultáneas, consultar detalle)
- 18:00-19:15 Póster Party y retirada de los pósters
- 19:15-20:00 CONFERENCIA PLENARIA ALBERTO SOLS-FUNDACIÓN BBVA
Sir Tom L. Blundell (University of Cambridge, UK)
- 20:00-20:20 Entrega del Premio Roche al mejor Póster, Premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly y el Premio Eppendorf a la mejor imagen científica del año
- 19:00-20:30 Actividad satélite LA BIOQUÍMICA EN LA CIUDAD. Bioquímica y cocina
 Conferencia y mesa redonda: *La gastronomía: ciencia, investigación y divulgación*
Lugar: Sala de Reuniones, Mercat de Santa Caterina
- 21:30 Cena de clausura

Programa científico

Todas las conferencias, comunicaciones y pósters presentados en este congreso pueden consultarse también por Internet (www.sebbm.com/xxxivcongreso) en pdf o en formato de buscador online.

CONFERENCIAS PLENARIAS

Martes 6 de septiembre

CONFERENCIA INAUGURAL Fundación Ramón Areces

11:30-12:15 **Sir Philip Cohen** (MRC, Dundee, UK)
(Auditorio) The interplay between phosphorylation and ubiquitylation in regulating innate immunity
Presentación: Joaquín Ariño

CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 1

12:15-13:00 **Richard Marais** (Cancer Research UK, Londres)
(Auditorio) New therapeutic opportunities for melanoma. From biochemistry to patient treatment
Presentación: Joan Seoane

CONFERENCIA PLENARIA L'ORÉAL

18:00-18:45 **Elisa Izaurralde** (Max Planck Institute, Tubingen)
(Auditorio) Dissecting the molecular mechanisms of miRNA-mediated gene silencing
Presentación: Montserrat Pagés

Miércoles 7 de septiembre

CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 2

10:30-11:15 **Michael N. Hall** (Biozentrum, Basilea)
(Auditorio) TOR signaling, from yeast to human
Presentación: Carme Caelles

CONFERENCIA PLENARIA H. NIEMEYER

12:15-13:00 **Martín Montecino Leonard** (CIB, Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile)
(Auditorio) Control epigenético de la expresión durante la diferenciación ósea
Presentación: Alicia Alonso

CONFERENCIA PREMIO PROMEGA BIOTECH IBÉRICA

13:00-13:30 **Sergi Regot** (Universitat Pompeu Fabra (UPF-CEXS))
(Auditorio) How to build biological computers
Presentación: Francesc Posas

CONFERENCIA PREMIO PROMEGA BIOTECH IBÉRICA (Accésit)

13:30-13:50 **María Moriel Carretero** (Universidad de Sevilla)
(Auditorio) Inestabilidad genética asociada a defectos en el complejo TFIIH
Presentación: Francesc Posas

Jueves 8 de septiembre

CONFERENCIA PLENARIA SIMPOSIO 3

10:30-11:15 **Luis Serrano** (CRG, Barcelona)
(Auditorio) A quantitative systems biology study on a model bacterium
Presentación: Rosa Aligué

CONFERENCIA PLENARIA L. LELOIR-PABMB

12:15-13:00 **Hugo D. Luján** (Universidad Católica de Córdoba, Argentina)
(Auditorio) Molecular mechanisms of antigenic variation in the intestinal parasite
Giardia lamblia
Presentación: Federico Mayor

CONFERENCIA PREMIO IZASA WERFEN

13:00-13:45 **Susana Rodríguez-Navarro** (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)
(Auditorio) Un viaje alucinante: siguiendo al mRNA, desde su síntesis hasta su traducción, de la mano de Sus1
Presentación: Diego Haro

CONFERENCIA PLENARIA ALBERTO SOLS-FUNDACIÓN BBVA

19:15-20:00 **Sir Tom L. Blundell** (University of Cambridge, UK)
(Auditorio) Genomes, structural biology and drug discovery
Presentación: Francesc Xavier Avilés

SIMPOSIOS

Martes 6 de septiembre

Simposio 1. Bioquímica y biología molecular del cáncer

Coordinado por: Joan Seoane

Esponsorizado por: EACR

Simposio 1.1. Alteraciones en la señalización celular y cáncer

Moderador: Joan Seoane (VHIO-UAB)

- | | |
|----------------------------|---|
| 16:00-16:30
(Auditorio) | Amancio Carnero Moya (IBiS, Sevilla)
Spinophilin, a new tumor suppressor at 17q21 |
| 16:30-17:00
(Auditorio) | Héctor G. Palmer (Vall d'Hebron IO, Barcelona)
Dissecting tumor anatomy: Intra-tumoral cell heterogeneity defines response to target-directed therapies |
| 17:00-17:30
(Auditorio) | Travis Stracker (Institut de Recerca Biomèdica, IRB Barcelona)
Tumorigenesis resulting from defective apoptosis is differentially influenced by cell cycle checkpoint signaling and DNA repair status |
| 17:30-18:00
(Auditorio) | Marcos Malumbres (CNIO, Madrid)
Mitosis: Genetic analysis and therapeutic opportunities |

Simposio 2. Señalización celular

Coordinado por: Francesc Posas

Simposio 2.1. Señalización y fisiología de la célula

Moderador: Agustina García (UAB)

- | | |
|-------------------------|--|
| 16:00-16:30
(Sala 6) | Ángel Rodríguez Nebreda (Institut de Recerca Biomèdica, IRB Barcelona)
Regulación celular por p38 MAPK |
| 16:30-17:00
(Sala 6) | Juan Luis Ramos Martín (CSIC-EEZ, Granada)
Complex transcriptional response to toxic compounds in <i>Pseudomonas</i> |

- 17:00-17:30 **Juan Pedro Bolaños** (Universidad de Salamanca)
(Sala 6) Regulation of the antioxidant response in neurons
- 17:30-18:00 **Markus Proft** (IBMCP, Valencia)
(Sala 6) The transcriptional response to osmotic stress in yeast

Simposio 3. El universo de las proteínas: estructura y función

Coordinado por: Francesc Xavier Avilés

Simposio 3.1. Análisis estructural, dinámica y acción de proteínas (SIMPOSIO HISPANO-LUSO)

Moderadores: Miguel Castanho y Miguel Ángel de la Rosa

- 16:00-16:30 **Nuria Verdaguer** (IBMB-CSIC, Universidad de Barcelona)
(Sala 5) The structure solution of «Big Guys»: X-ray diffraction and electron microscopy cooperation
- 16:30-17:00 **Miguel Castanho** (IMM, Universidade de Lisboa)
(Sala 5) Dengue virus capsid protein translocates nucleic acids
- 17:00-17:30 **Esteve Padrós** (Universidad Autónoma de Barcelona)
(Sala 5) Membrane sugar transporters: structure and function
- 17:30-18:00 **Cláudio M. Soares** (ITQB, Universidade Nova de Lisboa)
(Sala 5) Molecular mechanisms of ABC transporters: a simulation approach

Miércoles 7 de septiembre

Simposio 1.2. Supresores tumorales y oncogenes

Moderador: Alberto Muñoz (IIB, Madrid)

- 09:00-09:30 **Almudena R. Ramiro** (CNIO, Madrid)
(Auditorio) microRNA regulation of B cell fate
- 09:30-10:00 **Xosé R. Bustelo** (CIC, CSIC-Universidad de Salamanca)
(Auditorio) Pleiotropic roles of Vav family oncoproteins in skin and oral tumorigenesis

10:00-10:30 **Pedro Fernández Salguero** (Universidad de Extremadura, Badajoz)
(Auditorio) Retrotransposones modulados por AhR y por Slug: aisladores genómicos en el control de la expresión génica

Simposio 2.2. Señalización celular y desarrollo

Moderador: Juan P. Bolaños (U. Salamanca)

09:00-09:30 **Acaimo González-Reyes** (CABD, Sevilla)
(Sala 6) Cytosol-mediated delivery of Hedgehog regulates the expression of bone morphogenetic proteins to maintain germline stem cells in *Drosophila*

09:30-10:00 **Salomé Prat** (CNB, Madrid)
(Sala 6) Función del proteasoma en la integración de la señal luminosa en plantas

10:00-10:30 **Elisa Martí** (IBMB, Barcelona)
(Sala 6) Sonic hedgehog regulates the neural stem character in the developing nervous system

Simposio 3.2. El universo de las proteínas a través de la genómica, proteómica y bioinformática

Moderadores: Juan J. Calvete (IBV, Valencia) y Xavier Parés (UAB)

09:00-09:30 **Ana Conesa** (CIPF, Valencia)
(Sala 5) Aplicaciones de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva al estudio de la relación genoma-proteoma

09:30-10:00 **José Manuel Batista** (Universidad Complutense de Madrid)
(Sala 5) Un *blazar* postraduccional redox en malaria

10:00-10:30 **Baldomero Oliva** (UPF-PRBB, Barcelona)
(Sala 5) Scoring the network of protein-protein interactions

Jueves, 8 de septiembre

Simposio 1.3. Diferenciación celular en el cáncer

Moderador: Anna Bassols (UAB)

- 09:00-10:30 **Alberto Muñoz** (IIB, Madrid)
(Auditorio) Efectos de la vitamina D sobre la expresión génica y el fenotipo de células humanas de cáncer de colon
- 09:30-10:00 **Anna Bigas** (IMIM, Barcelona)
(Auditorio) Notch y leucemias T: con el permiso de NF-κB
- 10:00-10:30 **Luciano Di Croce** (Centre de Regulació Genòmica, CRG, Barcelona)
(Auditorio) Chromatin and its impact on gene expression and cancer

Simposio 2.3. Señalización y regulación genómica

Moderador: Fàtima Bosch (UAB)

- 09:00-09:30 **Pilar Santisteban** (IIB, Madrid)
(Sala 6) Análisis global de genes regulados por Pax8 en respuesta a cAMP: comunicación cruzada con las vías PI3K y Smads
- 09:30-10:00 **Miguel Beato** (Centre de Regulació Genòmica, CRG, Barcelona)
(Sala 6) Progesterone signaling in gene regulation
- 10:00-10:30 **Ana C. Carrera** (CNB-CSIC, Madrid)
(Sala 6) Función de 3'-polifosfoinosítidos en homeostasis del DNA

Simposio 3.3. Topografía proteica a nivel celular y tisular

Moderadores: Carles Arús (UAB) y Maria Solà (IBMB-CSIC)

- 09:00-09:30 **José Luis Capelo-Martínez** (Universidad de Vigo, Ourense)
(Sala 5) New approaches for on-tissue mass spectrometry-based mapping of peptides
- 09:30-10:00 **Nuria Rubio Vidal** (CIC, CSIC-ICCC, Barcelona)
(Sala 5) Fotoproteínas trazadoras para imagen no invasiva en terapia celular
- 10:00-10:30 **Francisco Javier Chichón** (CNB, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid)
(Sala 5) Cartografía de la infección del virus *Vaccina* a través de la criotomografía de rayos X

REUNIONES DE GRUPOS

Miércoles 7 de septiembre (15:30-18:00)

15:30-18:00
(Sala 3)

BASES MOLECULARES DE LA PATOLOGÍA

Coordinadores: Paloma Martín Sanz y Ángela Martínez Valverde

Ponencias invitadas (30 min cada una)

M^a Luz Martínez-Chantar (CICbioGUNE, Ciberehd)

El papel de LKB1 en la proliferación de carcinomas hepatocelulares derivados de NASH

Beatriz Rico (Instituto de Neurociencias, CSIC & Universidad Miguel Hernández)

Función de la Neuregulina 1 y su receptor ErbB4 en la formación de los circuitos GABAérgicos: etiología de la esquizofrenia

Rafael Blasco (CNIO, Madrid)

c-Raf pero no B-Raf es esencial en el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por el oncogén K-RasG12V

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Natalia Enguix Elena (Vall d'Hebron-Institut de Recerca, Barcelona)

Estudio de la función del coactivador transcripcional PGC-1 beta en el tejido adiposo blanco

M^a Esther Zurita Redondo (Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Madrid)

Caracterización de un nuevo modelo animal de degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

15:30-18:00
(Sala 5)

NEUROQUÍMICA

Coordinadores: Juan Pedro Bolaños y Francisco Ciruela

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Jesús Ávila (CBM-CSIC, Madrid)

La función de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer

Ángeles Almeida (Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca)

El polimorfismo Agr72Pro de p53 regula la apoptosis neuronal y condiciona el pronóstico funcional del ictus

Rafael Fernández-Chacón (IbiS, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/ Universidad de Sevilla)

Synaptic dysfunctions and activity-dependent neurodegeneration in mice lacking Cystein String Protein-alpha

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Antonio Rodríguez Moreno (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla)

Axonal locus of induction of t-LTD demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist

Carmen Rodríguez Ferrer (Universidad de La Laguna, La Laguna)

Caracterización del exoenzima NPP2/ATX de líquido cefalorraquídeo

Dasiel Oscar Borroto-Escuela (Karolinska Institutet, Stockholm)

FGFR1-5-HT1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity

Noemí García Tardón (CBM, Madrid)

Papel de la fosforilación en la endocitosis regulada del transportador de glutamato GLT1

15:30-18:00
(Sala 2)

BIOLOGÍA MOLECULAR TEÓRICA
Coordinadores: Juan Fernández Recio

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Adrian E. Roitberg (Florida University, USA)

Biomolecular simulations in the exascale era

José Manuel Sánchez-Ruiz (Universidad de Granada, Granada)

Protein engineering and evolution

Patrick Aloy (IRB, Barcelona, Barcelona)

A network medicine approach to human disease

Comunicaciones orales (25 min cada una)

Ignacio Enrique Sánchez Miguel (Universidad de Buenos Aires)

Discovery of functional protein linear motifs using a greedy algorithm and information theory

M^a Gema Codina Grau (Vall d'Hebron-Institut de Recerca)

Valoración de una PCR-RT multiplex en tiempo real para diagnóstico de infección respiratoria viral

15:30-18:00
(Sala 8)

APOPTOSIS

Coordinadores: Aránzazu Sánchez Muñoz e Isabel Marzo Rubio

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Cristina Muñoz Pinedo (IDIBELL, Barcelona)

Apoptosis típica y atípica inducida por inhibición del metabolismo glicolítico

Julián Pardo Jimeno (Universidad de Zaragoza, Zaragoza)

Potencial terapéutico de las células NK humanas en el tratamiento de neoplasias hematológicas resistentes a protocolos clásicos de quimioterapia

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Daniel Sanchís Morales (IRBLleida - Universitat de Lleida)

Endonucleasa G desempeña funciones importantes en la vida y la muerte del miocardio

Noemí Lourdes Álvarez Lindo (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC)

Reparación de roturas de DNA de doble hebra: implicación de la vía de reparación no homóloga en el desarrollo de la retina

M^a Luz Flores de Mera (Instituto de Biomedicina, IBiS, Sevilla)

La sensibilidad a paclitaxel en células de cáncer de mama requiere una parada eficiente en mitosis y la ruptura de la interacción Bcl-xL/Bak

Rubén Gómez Sánchez (Universidad de Extremadura, Cáceres)

Pink1: the *mito-guard* after the damage by CCCP

Victor J. Yuste Mateos (Universitat Autònoma de Barcelona)

Actinomycin D-mediated intracellular microRNA environment alteration and sensitization towards TRAIL-induced cell death in U87MG human-derived glioblastoma cells.

15:30-18:00
(Sala 11)

TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Coordinadores: Olga Martínez Augustin y Miquel Moretó Pedragosa

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Nancy Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, USA)

El transportador de yoduro NIS: fuente inagotable de sorpresas

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Natalia Grañé Boladeras (Universidad de Barcelona)

Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of solid tumors to drug therapy: a transportome approach

Javier Vaquero Rodríguez (Universidad de Salamanca)

La quimiorresistencia puede ser inducida por activación de FXR independiente de ácidos biliares en células hepáticas e intestinales

Araitz Alberdi Gonzalez (CSIC-UPV/EHU, Leioa)

Calmodulin independent trafficking of Kv7.2 channels

Elisa Lozano Esteban (Universidad de Salamanca)

Evaluación in vitro de la utilidad de derivados de ácidos biliares en el tratamiento del colangiocarcinoma

Maria Laura Aguilera Gil (Universidad de Barcelona)

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es secretada a través del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) en *Escherichia coli* enteropatógena

María del Carmen Álvarez Morales (Universidad de Córdoba)

Función del transportador TRK1 en la tolerancia a sal de la levadura *Hansenula polymorpha*

15:30-18:00
(Sala 7)

GENÓMICA Y PROTEÓMICA

Coordinadores: Esteban Ballestar y Juan José Calvete

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Sebastián Tanco (Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona)

Nuevas estrategias para degradación C-terminal de metalo carboxipeptidasas: buscando sustratos naturales in vivo y ex vivo

Maribel Parra (IDIBELL, Barcelona)

Papel del represor de la transcripción génica HDAC7 en linfocitos B.

Nuria López-Bigas (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona)

Integration and data-mining of multidimensional oncogenomic data.

Montserrat Carrascal (IIBB/CSIC y UAB, Barcelona)

Caracterización cuantitativa del fosfoproteoma del linfocito T primario durante su activación mediante marcaje isotópico y espectrometría de masas.

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Daniel Alejandro Medina Salas (Universitat de València)

El papel de la exonucleasa citoplasmática Xrn1 en la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*

Elias Mongiardini (Universidad Autónoma de Barcelona)

Proteomic characterization of the outer membrane vesicles produced by *Stenotrophomonas maltophilia*

15:30-18:00
(Sala 9)

REGULACIÓN METABÓLICA

Coordinadores: Marta Casado Pinna y Miguel Ángel Medina Torres

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Dolores Serra Cucurull (Universidad de Barcelona, Barcelona)

Estudio de la carnitina palmitoiltransferasa 1 como diana terapéutica de la obesidad

M^a José Martínez Díaz-Guerra (Universidad de Castilla-La Mancha)

La adenosina incrementa la expresión del gen *pfkfb3* a través de los receptores A2 y potencia el flujo glucolítico en macrófagos activados

Sonia Fernández Veleo (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII)

Papel de la quinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G (GRK2) en la resistencia a insulina y obesidad

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Silvia Marín Martínez (Universitat de Barcelona)

Characterization of the metabolic fluxes in the adipocyte differentiation process using bioinformatics tools

Giuseppe Pulice (IRB Barcelona, Barcelona)

A transcriptomic analysis of the white adipose tissue of p21 KO mice: new insights between cell cycle and metabolism

Maria Teresa Rubio López (Instituto de Biomedicina de Valencia/CSIC)

The E3-SUMO ligase PIASy mediates SUMO-2 conjugation of AMP-activated Protein Kinase β 2 isoform.

15:30-18:00
(Sala 6)

SEÑALIZACIÓN CELULAR

Coordinadores: Juan Manuel Zapata y María A. Balboa

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Anna Colell (IIBB-CSIC, Barcelona)

Regulación por colesterol de la respuesta celular frente al estrés oxidativo mitocondrial: implicaciones patológicas

Jaime Millán (CBM-CSIC/UAM, Madrid)

New insights into the molecular mechanisms regulating endothelial barrier function

Comunicaciones orales (20 min cada una)

María Pimentel Santillana (IIB "Alberto Sols", CSIC-UAM)

Crosstalk between signal transduction and metabolism in macrophages: Metabolic effects of MEK inhibition

Maria Dolors Oliver Guillén (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)

Las tres actividades de p65: proactivador de PI3K, modulador de PTEN e inductor de estructuras *tipo-blebs*

Laura Tatjer Recordà (Universitat Autònoma de Barcelona)

Using genetic approaches to gain insight into new functions of the Ptc1 type 2C phosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

M. Teresa Bertran Domingo (IRB Barcelona)

Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls prophase centrosome separation through Nek6/7 and the mitotic kinesin Eg5

15:30-18:00
(Sala 4)

TRANSGÉNESIS DE MAMÍFEROS
Coordinador: Juan Galcerán Sáez

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Heike Lerhmann (Sigma-Aldrich)

Applications of zinc finger nuclease technology. Gene knockout and targeted gene integration

Jaime Carvajal (ICR, Londres, UK)

Modification of BACs by homologous recombination: an essential tool for molecular embryology

Juan de Dios Hourcade (CIB-CSIC, Madrid)

Aspectos básicos en la identificación, mantenimiento y experimentación con modelos transgénicos murinos

Verónica Jiménez (CBATEG, UAB, Barcelona)

Generación de una librería de vectores adenoasociados (AAV) para la obtención de ratones condicionales de tejido

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Diego Muñoz (CBMSO-Universidad Autónoma de Madrid)

Generación de nuevos ratones transgénicos como modelos animales de la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica

Ana Méndez Zunzunegui (IDIBELL, Barcelona)

Transgénesis estable por inyección y electroporación in vivo de DNA en línea germinal masculina de ratón: reproducción de la metodología y análisis de sus limitaciones para su posterior uso en estudios de función génica en retina

15:30-18:00
(Sala 12)

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS
Coordinador: Mariam Sahrawy

Ponencias invitadas (20 min cada una)

Miguel Ángel Pérez-Amador (IBMCP-UPV-CSIC, Valencia)

Control hormonal del desarrollo del pistilo y la fructificación en *Arabidopsis*

David Caparrós Ruiz (CRAG-CSIC-IRTA-UAB, Barcelona)

Bioengineering of the lignocellulosic biomass in maize

María del Carmen Romero Puertas (EEZ-CSIC, Granada)

La S-nitrosilación como mecanismo de señalización en plantas: caracterización funcional del nitroproteoma del peroxisoma

Stephan Pollmann (CBGP, UPM-INIA, Madrid)

Auxin - oxylipin crosstalk in stress responses of plant roots

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Agnese Rabissi (CRAG. Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB)

Characterization of the SnRK1 complex involved in osmotic response

Judith Villanueva González (Neiker Tecnalia - Centro de Arkaute)

Identificación, aislamiento y caracterización de lectinas presentes en el látex de *Euphorbia trigona*

Renaldo José Salazar Fernández de Gamarra (Universidad Central de Venezuela)

Marcadores bioquímicos del proceso de embriogénesis somática en *Solanum tuberosum* cultivar granola

Jueves 8 de septiembre (15:30-18:00)

15:30-18:00
(Sala 2)

ENSEÑANZA DE LA BIOQUÍMICA Coordinador: Ángel Herráez Sánchez

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Rosa María Olmo López (Universidad Complutense de Madrid)
Congreso Virtual de Bioquímica en Grados de Ciencias de la Salud:
motivación y participación de los alumnos en la realización del póster.
Diferencias de enfoque

César Teijón López (Universidad Complutense de Madrid)
Congreso Virtual de Bioquímica en distintos Grados de Ciencias de la Salud: otras
formas de adquisición de conocimientos y de autoevaluación de los mismos

Ana M^a Rodríguez Guerrero (Universidad de las Islas Baleares)
Reuniones internacionales en el marco de proyectos europeos: una actividad
formativa de interés para estudiantes de Máster y Doctorado

Elena Carrasquer Álvarez (Universidad de Zaragoza)
Una forma más divertida de aprender el ciclo de Krebs propuesta por los alumnos
de 1º de Grado en Veterinaria **(30 min)**

M^a Pilar Roca Salom (Universidad de las Islas Baleares)
Creación del BQ-TRIVIAL: una actividad ECTS

María Jesús Miró Obradors (Universidad Complutense de Madrid)
Creación de una plataforma para la enseñanza y aprendizaje de la Bioquímica y
de la Biología Molecular y Celular (BBMC) en entornos web 2.0 y 3.0

Allan Orozco Solano (Instituto Nacional de Bioinformática, CNIO)
Bioinformática y Medicina molecular: caso de formación mediante tecnologías
aplicadas en biología molecular computacional dirigido hacia el sector clínico en
España

Josep M. Fernández Novell (Universidad de Barcelona)
El Club de los Jóvenes Bioquímicos (ITUs-Club)

15:30-18:00
(Sala 9)

BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Coordinadores: Leandro Sastre Garzón y Marian Ros Lasierra

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Enrique Martín Blanco (IBMB-CSIC, Barcelona)
Cellular and mechanical control of morphogenesis

Isabel Varela Nieto (IIB-CSIC/UAM, Madrid)
Proliferación celular y neurogénesis en el desarrollo del oído interno

Miguel Torres (CNIC, Madrid)
Competición celular en el desarrollo embrionario de los mamíferos

Comunicaciones orales (12 min cada una)

Juán José Sanz Ezquerro (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares)
Arid3b is required for heart development

Sonsoles Campuzano Corrales (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa)
Elementos reguladores de la expresión de los genes del complejo Iroquois en el gen adyacente *Sosondowah* mantienen ligados a estos genes a los largo de la evolución

Irene Bodega Mayor (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa)
Identificación de nuevos componentes del diagrama de filtración de *Drosophila melanogaster* por silenciamiento génico

15:30-18:00
(Sala 5)

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
Coordinador: Jesús Sanz Morales

Ponencias invitadas (30 min cada una)

José María Sánchez-Puelles (CIB-CSIC, Madrid)
HIF2a como diana farmacológica en la estrategia de diferenciación celular en cáncer

Antonio Jesús Ruiz Sánchez (Universidad de Málaga, Málaga)
Dendrímeros que emulan proteínas portadoras. Proceso de reconocimiento de Inmunoglobulinas

Marta Santos Cuesta (Universidad del País Vasco, Leioa)
Polihidroxialcanoato despolimerasas de origen bacteriano: Propiedades y aplicaciones en biotecnología

Comunicaciones orales (15 min cada una)

María de Gracia Retamosa Hernández (Universidad Miguel Hernández)
Specific immobilization and purification of recombinant proteins using diethylaminoethyl-functionalized magnetic nanoparticles

Laura Sánchez Vicente (Universidad de Salamanca)

Desarrollo de un test para la detección de contaminantes genotóxicos en alimentación humana y animal

Guiomar Sánchez Carrón (Universidad de Murcia)

Clonación y caracterización cinética de una nicotinamidasas de *Oceanobacillus iheyensis*

15:30-18:00
(Sala 8)

BIOMEMBRANAS Y BIOENERGÉTICA

Coordinadores: Ana M^a Mata Durán y Antonio Ferrer

Ponencias invitadas (30 min cada una)

Beatriz López Corcuera (CBM-CSIC/UAM y CIBERER, Madrid)

Regulación de neurotransportadores de glicina por receptores purinérgicos

Manuel Hervás (CicCartuja, Universidad de Sevilla-CSIC, Sevilla)

Transferencia electrónica al fotosistema I: in vivo *versus* in vitro

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Alejandro Cerrada de Dueñas (Universidad Complutense de Madrid)

Células madre mesenquimales derivadas de placenta como modelo para el estudio de la biogénesis y tráfico celular del surfactante pulmonar

Antonio Luis Egea-Jiménez (Universidad de Murcia)

Influencia del diacilglicerol y los ésteres de forbol en la unión de los dominios C1B de proteínas quinasas C a membranas modelo

María Pura Hortigón-Vinagre (Universidad de Extremadura)

Desregulación del transporte neto de Ca²⁺ por acción de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) en vesículas de retículo sarcoplásmico (RS) de músculo esquelético de conejo

Ana M^a Salvador-Ibáñez (Universidad del País Vasco)

Estudio 2DCOS del efecto del pH en la transición de fase lipídica en procesos amiloidogénicos

Laura Solé Codina (Universidad de Barcelona)

Formación selectiva de canales oligoméricos Kv7.5 (KCNQ5)/KCNE1 y Kv7.5 (KCNQ5)/KCNE3. Localización diferencial en microdominios de membrana

15:30-18:00
(Sala 6)

PARASITOLOGÍA MOLECULAR

Coordinador: Miguel Ángel Navarro Carretero

Ponencias invitadas (40 min cada una)

Dominique Soldati-Favre (University of Geneva, Suiza)
Molecular events governing the lytic cycle in Apicomplexa

Jeremy Mottram (University of Glasgow, UK)
Autophagy; cell survival and cell death in trypanosomatids

Comunicaciones orales (20 min cada una)

Diana López-Farfán (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. CSIC, Granada)
Chromatin SUMOylation promotes Variant Surface Glycoprotein transcription in *Trypanosoma brucei*

Guiomar Pérez-Moreno (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. CSIC, Granada)
Establecimiento del papel de la síntesis endógena de esteroides en la proliferación y morfología de *Trypanosoma brucei*

David León-Guerrero (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. CSIC, Granada)
Un nuevo transportador ABC implicado en la infectividad de *Leishmania*

15:30-18:00
(Sala 12)

BIOQUÍMICA PERINATAL

Coordinadores: Anna Gumá y M. del Pilar Ramos Álvarez

Ponencias invitadas (25 min cada una)

Óscar Fernández Capetillo (CNIO, Madrid)
Programación intrauterina del envejecimiento

Henar Ortega-Senovilla (Facultad de Farmacia, USP-CEU, Madrid)
Lípidos frente a glucosa durante la gestación en el control del peso corporal del recién nacido

Josep C. Jiménez-Chillaron (Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona)
La nutrición perinatal en ratones machos programa la expresión de genes lipogénicos en la segunda generación filial mediante mecanismos epigenéticos

Carmen Álvarez Escola (Universidad Complutense de Madrid, Madrid)

La subnutrición materna altera el desarrollo y funcionalidad del páncreas endocrino de la descendencia

Comunicaciones orales (15 min cada una)

Elisa Herráez Aguilar (Universidad de Salamanca)

Implicación de la fosfolipasa A2 en la etiopatogenia del distrés respiratorio del neonato asociado a la colestasis gestacional

Ana Velasco Criado (Universidad de Salamanca)

La agrupación celular promovida por el ácido oleico está disminuida en un modelo celular de síndrome de Down

15:30-18:00
(Sala 11)

RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Coordinadores: Manuel Portero Otín, Consuelo Borrás y José Viña

Ponencias invitadas (20 min cada una)

Alejandro Vaquero (ICREA / IDIBELL, Barcelona)

Role of SirT1 in oxidative stress response and genome stability

Joaquim Ros (Universitat de Lleida)

Estrés oxidativo en modelos celulares de ataxia de Friedreich

Susana Cadenas (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid)

Regulación de la proteína desacoplante UCP3 en condiciones de hipoxia

Mariona Jové (Universitat de Lleida)

Lipidomic analysis reveals novel mechanisms in redox homeostasis induced by dietary methionine restriction

Comunicaciones orales (10 min cada una)

José Carlos Aires (Universitat de Lleida)

Análisis funcional de las glutaredoxinas monotiólicas de plantas mediante su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*

María Ester González-Sánchez (Universidad de Salamanca)

Papel protector de la biliverdina frente al efecto tóxico de compuestos oxidantes endógenos y xenobióticos

Armando José Moreno-Cermeño (Universidad de Lleida)

Cambios metabólicos en el mutante condicional de frataxina en levadura

Elaine Ferreira (Universidad de Barcelona)

Análisis in vivo de la implicación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en la reparación del DNA en *Escherichia coli*

José Carlos Díez (Universidad de Alcalá)

Relación entre estrés oxidativo y apoptosis inducida por esculetina en células de leucemia promielocítica aguda humana NB4: efectos mitocondriales

Isaac Túnez Fiñana (Universidad de Córdoba)

Incremento plasmático de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina en pacientes con enfermedad de Huntington

Virginia Fernández Arancibia (Universidad de Chile)

Respuesta antiinflamatoria inducida por el preacondicionamiento con Fe frente a la isquemia-reperfusión hepática, con relación a cambios en estatus del Fe hepático

Beatriz Álvarez Castelao (IIB Alberto Sols, CSIC-UAM)

Mechanism of alpha-synuclein cleavage by the 20S proteasome. Inhibition of alpha-synuclein degradation by oxidation of its N-terminal methionines and reversion by methionine sulforeductase A

15:30-18:00
(Sala 3)

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
Coordinador: Guillermo Montoya Blanco

Ponencias invitadas (25 min cada una)

T. Goulas (IRBB-CSIC, Barcelona)

Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog

Sergio G. Bartual (IQFR-CSIC, Madrid)

Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip

Maria Solà (IBMB-CSIC, Barcelona)

Crystallography, SAXS and biochemistry joined to understand the binding of the human mitochondrial termination factor mTERF to its DNA cognate sequence

José Luis Vázquez (IRB Barcelona, Barcelona)

Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter.

J. Ricardo Arias-González (CNB-CSIC, Madrid)

El nuevo paradigma estructural de ADN y ARN de cadena doble

Conferencia Premio José Tormo (15 min)

Nereida Jiménez-Menéndez (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC)
Estudio estructural del factor de terminación de la transcripción mitocondrial mTERF en complejo con DNA

15:30-18:00
(Sala 7)

BIOQUÍMICA DE LA NUTRICIÓN
Coordinadora: Catalina Picó Segura

Ponencias invitadas (20 min cada una)

Marià Alemany (Universidad de Barcelona)
El síndrome metabólico

Paula Oliver (Universidad de las Islas Baleares)
Utilidad de las células sanguíneas (PBMC) como fuente de biomarcadores en estudios de nutrición y obesidad

María del Puy Portillo (Universidad del País Vasco)
¿Puede ser el resveratrol una molécula antiobesidad?

Montserrat Pinent (Universidad Rovira i Virgili)
El páncreas como diana de los efectos de las procianidinas de la uva

Comunicaciones orales (10 min cada una)

Marta Viana Arribas (Universidad San Pablo-CEU)
Obesidad e inflamación, ¿corre el tiempo a nuestro favor?

Joan Ribot Riutort (Universidad de las Islas Baleares)
La suplementación moderada con vitamina A durante la lactancia aumenta la obesidad inducida por la dieta en ratas

Juan Peragón Sánchez (Universidad de Jaén)
El ácido maslínico estimula las deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato en la dorada (*Sparus aurata*)

M. Antonia Murcia (Universidad de Murcia)
Valoración del estado nutricional de enfermos de Alzheimer

15:30-18:00
(Sala 4)

METABOLISMO DEL NITRÓGENO
Coordinadora: M. José Bonete

Comunicaciones orales (10 min cada una)

David Correa Galeote (Estación Experimental del Zaidín, Granada)

Distribución espacial de comunidades bacterianas asociadas al ciclo del nitrógeno en sedimentos de un humedal artificial en el Parque Nacional Doñana

Carlos Bricio Garberi (Universidad Autónoma de Madrid)

Producción de óxidos de nitrógeno gaseosos en *Thermus thermophilus*

Javier Canales Carrasco (Universidad de Málaga)

Caracterización de un péptido antimicrobiano relacionado con la absorción de amonio en las raíces del pino marítimo

Isabel Manso Cobos (Universidad de Córdoba)

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344: un cianotrofo productor de bioplásticos

Carmen Pérez Delgado de Torres (Universidad de Sevilla)

Efecto de la fotorrespiración y de la fuente nitrogenada en la transcripción de los genes de asimilación de amonio en *Lotus japonicus*

Laia Pedro Roig (Universidad de Alicante)

Proteínas PII en *Haloferox mediterranei*: modificación covalente y patrón de expresión

Erena Gil Quintana (Universidad Pública de Navarra, Pamplona)

Regulación local de la fijación biológica de nitrógeno en *Medicago truncatula*: una aproximación proteómica

Alejandro Lafuente Pérez (Universidad de Sevilla)

Herramientas genéticas para investigar el efecto del arsénico sobre la interacción leguminosa-Rhizobium

María Jesús Torres Porras (Estación Experimental del Zaidín, Granada)

Control redox de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. Implicación de RegSR

Zahira González-Sánchez (Universidad de Córdoba)

Caracterización molecular de NRT1 de *Chlamydomonas reinhardtii*

Norberto Escudero Urquijo (Universidad de La Laguna)

Las arrestinas en la regulación del transportador de nitrato Ynt1 en levaduras

Gracia Becerra León (Universidad de Extremadura)

En la bacteria cianotrófica *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 la expresión del sRNA PrrF está regulada por Fur

Actividades satélites

BIOQUÍMICA EN LA CIUDAD

Miércoles 7 de septiembre 2011

La modificación genética de plantas y animales. Usos y debates

Lugar: Aula Magna de la Facultad de Medicina (**Universidad de Barcelona**)
C/ Casanova 143. 08036 Barcelona

Día y hora: **7 de septiembre de 2011, 19 horas**
Entrada libre

Conferencia y coloquio:
La modificación genética de plantas y animales. Usos y debates

A cargo de:

Dr. Pere Puigdomènech (investigador y director del CRAG, Centro de Investigación en Agrigenómica, Campus UAB, Cerdanyola del Vallès).

Dr. Lluís Montoliu (investigador, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Jueves 8 de septiembre de 2011

Bioquímica y cocina

Lugar: **Sala de reuniones**, Mercat de Santa Caterina
Av. Francesc Cambó, 16, 08003 Barcelona

Día y hora: 8 de septiembre de 2011, 19 horas
Entrada libre

Conferencia y mesa redonda:

La gastronomía: ciencia, investigación y divulgación

A cargo de:

Dr. Unai Ugalde (profesor e investigador, Facultad de Química de San Sebastián, UPV/EHU).

Pere Castells (responsable del Departamento de Investigación. Fundación ALICIA).

Dr. Fernando Giráldez (profesor e investigador, CEXS-Universitat Pompeu Fabra. PRBB).

FORO DEL EMPRENDEDOR

Lunes 5 de septiembre 2011

De la generación de conocimiento a la generación de valor: superando el valle de la muerte

Lugar: **Auditorio (8ª planta) Torre Werfen**

Pza. Europa 21-23, L'Hospitalet de Llobregat

Salida Bus 8:30h (delante del Catalonia Plaza)

Coordinadores: **Luis Ruiz** (Janus Developments), **Rosa Aligué** (Universitat de Barcelona).

Con la colaboración de IZASA-WERFEN

- | | |
|-------------|--|
| 9:00 | Presentación. Federico Mayor (Presidente Electo de SEBBM) |
| 9:15-10:30 | Conceptualización: definir productos o servicios a partir del conocimiento

Rosario Osta (Universidad de Zaragoza)
Juan Arias (ABG patentes)
Clara Campàs (Advancell) |
| 10:30-11:00 | <i>Coffee break</i> |

- 11:00-12:15 **Maduración: definir y ejecutar planes para encarrilar el conocimiento en la cadena de valor**
Modera: Xavier Ferràs (ACCIÓ)
- Genoma España (Rafael Camacho)
Pablo Ortiz (Digna Biotech)
Maribel Berges (Janus Development)
- 12:15-13:30 **Comercialización: transferir el conocimiento en forma de licencia o spinoff**
- Marisol Soengas (CNIO-Bioncotech)
Lourdes Jordi (FBG-Fundació Bosch Gimpera UB)
Eduardo Almenara (OTRI, Universidad de Zaragoza)
- 13:30-15:30 *Comida con los ponentes*
- 15:30-16:45 **Financiación del valle de la muerte: capital concepto y semilla, programas públicos de valorización**
Modera: Isabel Garcia, ASEBIO
- Josep M^a Echarri (Inveready)
Pilar Sanz (CDTI)
Rafael Camacho (Genoma España)
- 16:45 -18:00 **Experiencias**
Modera: Luis Ruiz, Janus Development
- Anna Puigdemont (Univet)
Antonio Martínez (Progenika)
Antonio Parente (Grupo Lipotec)
- 18:00-18:30 *Coffee break*
- 18:30-19:30 **Proyectos**
Presentación de los proyectos finalistas y anuncio del ganador
- 19:30-20:00 **Conclusiones finales y clausura**
Miguel Ángel de la Rosa (Presidente de SEBBM)

CURSO DE INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Lunes 5 de septiembre de 2011

Sede del curso: Palau de Congressos de Barcelona (Montjuïc, Barcelona) (**Sala 4**)

Coordinadora: **Mireia Duñach** (Universidad Autónoma de Barcelona)

Programa

Sesión de mañana

- 09:00-09:15 **Bienvenida** (Joaquín Ariño, Presidente del Comité Organizador del XXXIV Congreso de la SEBBM)
- 09:15-10:00 **Bioinformática del genoma**
Roderic Guigó (Centre de Regulació Genòmica, Barcelona)
- 10:00-10:45 **Estructura 3D de grandes complejos macromoleculares mediante microscopía electrónica**
Oscar Llorca (Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid)
- 10:45-11:15 *Café con los conferenciantes*
- 11:15-12:00 **Nuevos aspectos en la regulación del metabolismo del sistema nervioso**
Juan Bolaños (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca)
- 12:00-12:45 **Regulación génica y control de la división celular**
Crisanto Gutiérrez (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-CSIC, Madrid)
- 13:00 *Almuerzo con los conferenciantes*

Sesión de tarde

- 15:00-15:45 **Células madre adultas: biología y terapia**
Isabel Fariñas (Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia)
- 15:45-16:30 **Avances recientes en el desarrollo**
Acaimo González-Reyes (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Sevilla)
- 16:30-17:00 *Café con los conferenciantes*
- 17:00-17:45 **La aventura de la carrera investigadora**
Irene Díaz (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis-CSIC, Universidad de Sevilla)
Joan J. Guinovart (IRB Barcelona, Universidad de Barcelona)
- 17:45-18:30 **Coloquio con los ponentes del Curso**
Moderador: Mireia Duñach (Comité Organizador del XXXIV Congreso de la SEBBM)

MESA REDONDA L'ORÉAL/AMIT**Martes 6 de septiembre 2011**

- 18:45-18:55 **Conmemoración del Año Internacional de las Mujeres Científicas**
Auditorio
Marie Curie y su envidiable familia
Flora de Pablo
- 18:55-19:45 **Mesa redonda L'Oréal-AMIT**
Auditorio
Evaluación de la actividad académica
- Moderador:* Miguel Ángel de la Rosa, presidente de la SEBBM
- Participan:*
Zulima Fernández, directora de la ANECA
Victoria Ley, directora de la ANEP
Inés Sánchez de Madariaga, directora de la UMYC

MESA REDONDA SOBRE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Martes 6 de septiembre 2011

13:30-14:15

Auditorio

Año internacional de la Química: una oportunidad para la divulgación de la ciencia

Participan:

Joan J. Guinovart, investigador, director del IRB Barcelona y expresidente de COSCE

Jaume Estruch, editor científico

Bernardo Herradón, científico del CSIC

Michele Catanzaro, doctor en Física y periodista *freelance*

Isabel Varela-Nieto, profesora de investigación del CSIC y secretaria científica de la SEBBM

Conferencias Plenarias

Conferencia Inaugural “Fundación Ramón Areces”

CP1

The interplay between protein phosphorylation and protein ubiquitylation in regulating the innate immune system

Philip Cohen

MRC Protein Phosphorylation Unit and Scottish Institute for Cell Signaling, The Sir James Black Centre, University of Dundee, Dundee (UK)

Infection by bacteria and viruses triggers cells of the innate immune system to produce inflammatory mediators and interferons that mount the responses to fight the invading pathogens. However these defence mechanisms are a double-edged sword because the uncontrolled production of these substances causes chronic inflammatory and autoimmune diseases. The talk will focus on an overview of the signaling pathways downstream of Toll-Like Receptors (TLRs) and the interleukin-1 receptor (IL-1R) with emphasis on recent contributions of my laboratory. The activation of TLRs by their ligands triggers the formation of Lys63-linked polyubiquitin chains and Lys63-linked polyubiquitylated proteins, which recruit and activate key protein kinases that control the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferons. The mechanisms that initiate the formation of Lys63-linked polyubiquitylated chains and proteins and the physiological roles of proteins with which they interact (NEMO, OPTN, ABIN1 and ABIN2) will be discussed, and how the canonical I κ B kinases (IKK α and IKK β) and the IKK-related kinases (IKK ϵ and TBK1) regulate each other to control innate immunity will be presented.

Conferencia Plenaria Simposio 1

CP2

New therapeutic opportunities for melanoma. From biochemistry to patient treatment

Richard Marais

Division of Cancer Biology, The Institute of Cancer Research, London (UK)

Conferencia Plenaria L'Oréal

CP3

Dissecting the molecular mechanisms of miRNA-mediated gene silencing

Elisa Izaurralde

Max-Planck-Institute for Developmental Biology, Tübingen (Germany)

miRNAs are key regulators of gene expression that post-transcriptionally silence mRNA targets containing partially or fully complementary sequences. To do so, they associate with Argonaute and GW182 family proteins into effector complexes known as miRNA-induced silencing complexes (miRISCs), which repress translation and promote target mRNA deadenylation. Deadenylation decreases translation efficiency and, in somatic cells, commits the mRNA to exonucleolytic degradation. Our analysis of GW182 protein function has revealed two domains critical for silencing: an N-terminal GW-repeat-containing region conferring binding to AGOs, and a bipartite silencing domain, consisting of Middle and C-terminal regions, which elicits translational repression and degradation of miRNA targets. Exactly how the silencing domain of GW182 proteins interferes with translation and accelerates deadenylation is not completely understood. We have recently started to address this question by showing that the silencing domains of GW182 interact with the cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1), suggesting GW182 proteins interfere with the function of PABPC1 in translation and mRNA stabilization. Furthermore, in a screen for proteins interacting with the GW182 silencing domains we identified subunits of the two major cytoplasmic deadenylase complexes: the PAN2-PAN3 and the CCR4-CAF1-NOT complexes, both of which in turn interact with PABPC1. These interactions are conserved and critical for silencing in *D. melanogaster* and human cells. Together, our findings indicate that the silencing domains of GW182 proteins provide a binding platform for deadenylation factors and PABPC1, creating an intricate network of protein-protein interactions which causes the rapid deadenylation of miRNA targets.

Conferencia Plenaria Simposio 2

CP4

TOR signaling, from yeast to human

Michael N. Hall

Biozentrum, University of Basel, Basel (Switzerland)

TOR (target of rapamycin) is a highly conserved serine/threonine kinase that controls cell growth and metabolism in response to nutrients, growth factors, cellular energy, and stress. TOR was originally discovered in yeast but is conserved in all eukaryotes including plants, worms, flies, and mammals. The discovery of TOR led to a fundamental change in how one thinks of cell growth. It is not a spontaneous process that just happens when building blocks (nutrients) are available, but rather a highly regulated, plastic process controlled by TOR-dependent signaling pathways. TOR is found in two structurally and functionally distinct multiprotein complexes, TORC1 and TORC2. The two TOR complexes, like TOR itself, are highly conserved. Thus, the two TOR complexes constitute an ancestral signaling network conserved throughout eukaryotic evolution to control the fundamental process of cell growth. As a central controller of cell growth, TOR plays a key role in development and aging, and is implicated in disorders such as cancer, cardiovascular disease, obesity, and diabetes. While the role of TOR in controlling growth of single cells is relatively well understood, the challenge now is to understand the role of TOR signaling in coordinating and integrating overall body growth and metabolism in multicellular organisms. This will require elucidating the role of TOR signaling in individual tissues. Data on the role of mTORC1 and mTORC2 in specific tissues will be presented. Recent results on the mechanism of mTORC2 regulation will also be presented.

Dentro del núcleo eucariótico el DNA se organiza como cromatina, una estructura núcleo-proteica altamente organizada. El nucleosoma es la unidad fundamental de esta cromatina y está compuesto por un segmento de DNA de 147 pb enrollados sobre un "core" de proteínas histónicas. La conformación y remodelación de la cromatina, a través de mecanismos epigenéticos, tiene una función clave en la modulación de la expresión génica durante la diferenciación celular. En esta presentación se discutirán mecanismos moleculares básicos asociados con la regulación de la expresión de genes durante el compromiso celular con el linaje óseo. Especial énfasis se dará a la contribución de mecanismos epigenéticos mediados por complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes de la familia SWI/SNF, así como también a complejos proteicos que catalizan modificaciones post-traduccionales de histonas (acetilación y metilación), en respuesta a la acción de morfógenos como BMP2 y a la hormona 1 α ,25-dihidroxi vitamina D3, ambos relevantes en el establecimiento de fenotipo óseo. Particular consideración se tendrá también hacia factores de transcripción que actúan reclutando estos complejos hacia regiones regulatorias específicas en los promotores de genes que se activan o reprimen durante la diferenciación osteoblástica. Los resultados definen una contribución relevante de factores de transcripción como Runx2 y C/EBP β en los procesos de reclutamiento de complejos con actividad SWI/SNF y modificadores de histonas nucleosomales, sobre genes óseos. Este reclutamiento selectivo se traduce tanto en activación de genes óseo-específicos como en la represión de genes asociados con la proliferación de células pre-osteoblásticas, evento que precede al compromiso con el linaje óseo.

Conferencia Plenaria H. Niemeyer

CP5

Control epigenético de la expresión durante la diferenciación ósea

Martín Montecino, Hugo Sepúlveda, Philippe Pihan, Rodrigo Aguilar y Adriana Rojas

Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello, Santiago (Chile)

Conferencia Premio Promega Biotech Ibérica

CP6

How to build biological computers

Sergi Regot¹, Javier Macia¹, Núria Conde¹, Kentaro Furukawa², Jimmy Kjellén², Tom Peeters¹, Stefan Hohmann², Eulàlia de Nadal¹, Francesc Posas¹ y Ricard Solé¹

¹Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, ²Gothenburg University, Gothenburg (Sweden)

Ongoing efforts within synthetic and systems biology have been directed towards the building of artificial computational devices using engineered biological units as basic building blocks. Such efforts, inspired in the standard design of electronic circuits, are limited by the difficulties

arising from wiring the basic computational units (logic gates) through the appropriate connections, each one to be implemented by a different molecule. In this paper, we showed that there is a logically different form of implementing complex Boolean logic computations that reduces wiring constraints thanks to a redundant distribution of the desired output among engineered cells. A practical implementation was presented using a library of engineered yeast cells, which could be combined in multiple ways. Each construct defined a logic function and combining cells and their connections allowed building more complex synthetic devices. As a proof of principle, we implemented many logic functions by using just a few engineered cells. Of note, small modifications and combination of those cells allowed for implementing more complex circuits such as a multiplexer or a 1-bit adder with carry, showing the great potential for re-utilization of small parts of the circuit. Our results support the approach of using cellular consortia as an efficient way of engineering complex tasks not easily solvable using single-cell implementations.

Conferencia Premio Promega Biotech Ibérica (Accésit)

CP7

Inestabilidad genética asociada a defectos en el complejo TFIIH

María Moriel Carretero, Cristina Tous y Andrés Aguilera

CABIMER-Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine (Universidad de Sevilla - CSIC), Sevilla

La correcta reparación de la molécula de DNA es esencial para preservar la estabilidad genética. Una vía fundamental de reparación es la reparación por escisión de nucleótidos (NER). El complejo TFIIH es esencial en este proceso, por lo que defectos en él provocan síndromes humanos como *Xeroderma pigmentosum* (XP), síndrome de Cockayne (CS) y tricotodistrofia (TTD). Otra vía fundamental de reparación es la recombinación homóloga (HR), que repara cortes de doble cadena en el DNA (DSB). Hemos caracterizado el defecto de un mutante atípico de la helicasa Rad3 de TFIIH en *S. cerevisiae*, *rad3-102*, que no es sensible a daño por luz UV pero necesita la HR para sobrevivir. Esto se debe a que, en *rad3-102*, la reacción de NER se aborta prematuramente dejando un hueco en e

IDNA que la horquilla replicativa transforma en DSB, lo que exige la intervención de la HR. Esto establece una íntima conexión entre dos vías fundamentales de reparación del DNA y reconsidera aspectos básicos de las patologías asociadas a TFIIH. Además, que *rad3-102* cause rotura de las horquillas replicativas lo convierte en herramienta para estudiar las proteínas involucradas en rescatar dichas horquillas. Así hemos determinado dos subvías de recombinación involucradas en este proceso. Por último, como la eliminación de los estadios tempranos de NER suprime los fenotipos asociados a *rad3-102*, esto permite detectar nuevos factores involucrados en los pasos iniciales de NER. Así hemos determinado que la cochaperona Ydj1 preserva todas las funciones de TFIIH. Siete de los diez componentes de TFIIH presentan motivos de unión a Ydj1, que estaría promoviendo la adecuada estequiometría del complejo, presumiblemente en cooperación con una amplia red de chaperonas.

Conferencia Plenaria Simposio 3

CP8

A quantitative systems biology study on a model bacterium

Luis Serrano Pubull

CRG, Barcelona

The goal of systems biology is to provide a quantitative and predictive description of a living system to the extent that it can be fully simulated in a computer. We have undertaken such endeavour using as a model the small bacterium, *M. pneumoniae* use *Mycoplasma pneumoniae*, a human pathogenic bacterium causing atypical pneumonia as model system for our study. Containing a reduced genome with only 690 ORFs, this bacterium is an ideal organism for exhaustive quantitative and systems-wide studies, avoiding technical limitations due to exceeding sample complexity, constrained by limitations in dynamic range and resolution of current generation mass spectrometers. Available data on the transcriptome, on protein complexes, as well as on metabolic pathways facilitate the integration of the data generated for this study into an organism-wide context. Additionally, *M. pneumoniae* represents a relevant organism to study stochastic noise in living systems. The cells are significantly smaller than other bacteria, such as *Escherichia coli* (0.05 μm^3 and 1 μm^3 , respectively) resulting in principle in an increased susceptibility to abundance fluctuations of cellular molecules. Our analysis shows that even apparently simpler organisms have a large

hidden layer of complexity and that for every question we have answered we have got two new ones. We are still far away to get a full understanding of a cell.

Conferencia Plenaria L. Leloir-PABMB

CP9

Molecular mechanisms of antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*

Hugo D. Lujan

*Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology,
School of Medicine, Catholic University of Cordoba,
Cordoba (Argentina)*

Antigenic variation involves the permanent switching of homologous, antigenically different cell surface molecules. In pathogenic parasites, antigenic variation is often described as a mechanism to evade the host immune system and therefore is responsible for the generation of chronic and/or recurrent infections. The intestinal protozoan parasite *Giardia lamblia* undergoes antigenic variation through the continuous switching of ~200 variant-specific surface proteins (VSPs). We presented evidence that *vsp* expression is regulated post-transcriptionally by a mechanism displaying features of RNAi. *Giardia* trophozoites expressing a single VSP transcribe many other *vsps*, but only accumulate the transcript that is translated and expressed on the trophozoites' surface. Antisense *vsp* transcripts and their corresponding small 25-nt-long RNAs were detected for the silenced but not for the expressed *vsp*. In addition, direct evidence for the participation of known components of the RNAi machinery in higher eukaryotes in the regulation of VSP expression in *Giardia* was obtained by knocking-down RNA-dependent RNA-polymerase RdRP and Dicer, resulting in an alteration of the VSP expression pattern in which more than one VSP were expressed on the surface of individual trophozoites. Given that parasite protection against specific immune responses relies on switching the expression between immunologically distinct surface proteins, one way in which hosts can prevent infections with a specific immunological response is by targeting all surface antigenic determinants. Experiments in animals either by infecting with the transgenic cells or by immunizing with VSPs purified from these cells generated total protection to subsequent *Giardia* infections.

Conferencia Premio Izasa-Werfen

CP10

Un viaje alucinante: siguiendo al mRNA, desde su síntesis hasta su traducción, de la mano de Sus1

Susana Rodríguez Navarro

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia

La protección del material genético mediante su compartimentalización en el núcleo celular supuso un hito en la evolución. Este hecho, dio origen a la aparición de la célula eucariota que se caracteriza por la existencia de un núcleo, separado por membrana del citoplasma. Si bien esta compartimentalización otorgó ventajas para aumentar su complejidad, también generó una barrera física entre los procesos específicos de cada compartimento. Los genes se localizan en el núcleo, pero sus productos son traducidos a proteínas en el citoplasma. El RNA mensajero es sintetizado y procesado en el núcleo antes de emprender su viaje a través de los poros nucleares. Numerosas evidencias demuestran que la exportación del mRNA depende de etapas anteriores a la propia salida a través de estas estructuras, introduciendo así el concepto de procesos acoplados durante la biogénesis del mRNA. Durante los últimos años mis investigaciones se han centrado en entender como el RNA mensajero es sintetizado y exportado, analizando los mecanismos moleculares que regulan el proceso. A partir del descubrimiento de Sus1p, hemos podido avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de este acoplamiento. Sus1 es un factor, conservado en la evolución que interacciona físicamente con dos complejos; el complejo SAGA, un coactivador transcripcional y a TREX2, localizado en el poro nuclear e implicado en la exportación de mensajeros. Esta interacción física facilita el acoplamiento de ambos procesos durante la expresión génica. Mediante el estudio de Sus1 y aquellas proteínas relacionadas física y funcionalmente con ella, hemos podido profundizar en el estudio de los modelos de acoplamiento que operan durante la expresión génica y que serán discutidos en esta charla.

Conferencia Plenaria

Alberto Sols-Fundación

BBVA

CP11

Genomes, structural biology and drug discovery: making new medicines for cancer

Tom L. Blundell*Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge (UK)*

Next generation sequencing projects together with high-throughput biophysical and structural analyses are transforming our knowledge of normal and diseased cells, including the molecular structures and interactions that mediate cell signalling and regulation. Nowhere is this having a greater impact on understanding disease than in cancer where the affects of many Mendelian and somatic mutations are beginning to be understood in terms of cell organisation, molecular structure and function, and new targets are being explored that include multiprotein regulatory systems. I will describe computational approaches to modelling and analysis of cancer somatic mutations using software pipelines developed in house. I will also describe the use of fragment-based approaches, focusing on targeting protein-protein interactions. I will exemplify our approach with targeting *(i)* double-strand break repair during chemo- or radiotherapy and *(ii)* the Met receptor interaction with hepatocyte growth factor/scatter factor, important in regulating metastasis.

Simposio 1:
Bioquímica y biología molecular del cáncer

Los resúmenes que optaban a alguno de los premios del XXXIV Congreso de la SEBBM llevan la correspondiente letra en su referencia: **e** (premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer), **m** (premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly) y **r** (premio Roche al mejor póster)

S1.1. Alteraciones en la señalización celular y cáncer

S1.1-1

Spinophilin, a new tumor suppressor at 17q21

Amancio Carnero Moya
 Instituto de Biomedicina de Sevilla/HUVR, CSIC,
 Sevilla

The scaffold protein spinophilin is a regulatory subunit of phosphatase 1a (PP1a) located at 17q21.33. This region is frequently associated with microsatellite instability and LOH and contains a relatively high density of known tumor suppressor genes (such as BRCA1), putative tumor suppressor genes, and several unidentified candidate tumor suppressor genes located distal to BRCA1. We have also recently found that Spn protein is lost in 20% and reduced in another 37% of human lung tumors. Furthermore, in animal models, loss of SPN increases tumorigenesis in vivo. We found that loss of Spn increases the onset of lymphoma in mice, and increases the apparition of mammary carcinomas in a mutant p53 background. To determine how loss of Spinophilin may contribute to tumorigenesis we explored the contribution of SPN to PP1a-mediated Rb regulation and their relationship to tumorigenesis. We found that the loss of Spinophilin downregulated PPP1CA and PP1a activity, resulting in a high level of pRb, which in turn, resulted in increased p53 activity through ARF. However, in the absence of p53, reduced levels of SPN enhanced the tumorigenic potential of the cells. Furthermore, the ectopic expression of SPN in human tumor cells from different types of malignancies greatly reduced cell growth. Taken together, our results show that the loss of Spinophilin induces a proliferative response by increasing Rb phosphorylation, which in turn activates p53, thereby, at least partially, neutralizing the proliferative response. The absence of p53 bypasses this barrier and enhances the malignant phenotype. Therefore, we suggest that Spinophilin may be the tumor suppressor gene that is located at 17q21.33, distal to BRCA1, and that its tumor suppressive function is dependent on the absence of p53.

S1.1m-2

Dissecting tumor anatomy: Intra-tumoral cell heterogeneity defines response to target-directed therapies

Stephan Tenbaum¹, Paloma Ordoñez-Moran², Isabel Puig¹, Josep Tabernero³, Alberto Muñoz² y Héctor G. Palmer¹

¹Laboratorio de Células Madre y Cáncer. Programa de Investigación Translacional. Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona, ²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid, ³Servicio de Oncología. Hospital Universitario Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona

Accumulated evidences indicate that most solid tumors are not homogeneous but built of cancer cell populations with divers biological properties. They follow a hierarchical organization in which self-renewing cancer stem cells (CSC) are in the apex of a differentiation process within the cancerous tissue. CSC can also compose the small reservoir of drug-resistant cells responsible for tumor relapse or can give rise to metastasis. Our laboratory is exploring such heterogeneity and describing novel populations of cancer cells within colon carcinomas responsible for drug-resistance, relapse or metastasis, all clinical determinants of patients' survival. Blocking signaling pathways that drive CSC distinctive properties is a new strategy being recently explored in clinical oncology by the use of novel target-directed drugs. Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT are two of these pathways playing a central role in CSC homeostasis. We have described the function of their corresponding effectors - β -catenin and FOXO3a - cooperating in colon cancer. Their activation promotes cell scattering and metastasis regulating a set of common target genes. Unexpectedly, the anti-tumoral AKT inhibitor API-2 promotes nuclear FOXO3a accumulation and metastasis from cells with high nuclear β -catenin. β -catenin confers resistance to FOXO3a-induced apoptosis promoted by PI3K and AKT inhibitors in patient-derived cells enriched in CSC, that is reverted by Wnt/ β -catenin inhibitor XAV-939. Our findings could have a serious impact on therapy since we demonstrate that nuclear β -catenin heterogeneity compromises the response of different cancer cell populations to anti-tumoral drugs currently in clinical trials and directed against PI3K/AKT oncogenic signal.

S1.1m-3

Tumorigenesis resulting from defective apoptosis is differentially influenced by cell cycle checkpoint signaling and DNA repair status

Steven S. Foster¹, Saurav De¹, John H.J. Petrini¹ y Travis H. Stracker²

¹*Sloan-Kettering Institute, New York (USA)*, ²*IRB Barcelona, Barcelona*

The DNA damage response (DDR) is crucial for detecting chromosomal aberrations and orchestrating the appropriate cellular responses. Many DDR genes are mutated in hereditary disorders characterized by chromosomal instability, severe developmental pathologies and predisposition to cancer. Among these are members of the Mre11 complex, a sensor of DNA breaks, and the central signal transducing kinase ATM. We have used combinations of mouse mutants with defects in particular facets of the DDR to delineate the relative contributions of apoptosis, DNA repair and cell cycle checkpoints to tumor suppression. Tumorigenesis resulting from defects in apoptosis were enhanced by defects in the intra-S and G2/M cell cycle checkpoints, providing direct evidence of their contribution. Further, we established evidence that apoptotic defects were not sufficient for promotion of medulloblastoma or lymphoma arising from DSB repair deficiency, also implicating DDR induced p53 regulation of cell cycle progression or senescence as a major determinant of tumor suppression. Collectively, our results indicate that particular combinations of DDR defects contribute to hereditary cancer predisposition and that the ability of genomic instability to promote tumorigenesis is type and context specific.

S1.1m-4

Mitosis: Genetic analysis and therapeutic opportunities

Marcos Malumbres
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid

Mitosis is the process by which cells segregate the previously duplicated genome into two daughter cells. This process is mainly controlled by protein phosphorylation and degradation. Several mitotic kinases, including members of the Aurora or Polo families, are required for mitotic entry and their inhibition results in cell cycle arrest and apoptosis. On the other hand, proteolysis is mostly regulated by the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), an

E3-ubiquitin ligase that mediates the ubiquitination of a wide variety of cell cycle proteins. The APC/C is modulated by two cofactors, Cdc20 and Cdh1, which select and target the proper substrates such as kinases and kinase regulators for degradation. During mitotic exit, the elimination of mitotic phosphates requires the activation of phosphatases, whose identity is not well understood in mammals. We have recently addressed the relevance of mitotic kinases and APC/C cofactors using conditional gene-targeted alleles in the mouse. All proliferating cells tested, including progenitor or very aggressive tumor cells, arrest in metaphase upon deletion of the APC/C cofactor Cdc20 in vivo. We will provide experimental evidence for the molecular pathways required for mitotic exit in Cdc20-null cells, including the relative function of the PP2A phosphatases and mitotic kinases such as Cdk1, Plk1 or Mastl (Greatwall). The physiological relevance of these kinases or putative APC/C-Cdc20 inhibitors in vivo or their possible use for cancer therapy will be discussed.

S1.2. Supresores tumorales y oncogenes

S1.2-1

microRNA regulation of B cell fate

Almudena R. Ramiro
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid

microRNA are small RNA molecules that regulate gene expression by inhibiting protein translation or promoting RNA regulation. We have explored microRNA function in B cell differentiation and function by three independent strategies. First, we generated a mouse model for global microRNA depletion late in B cell differentiation and found that absence of microRNAs both impairs the development of a B cell subset named follicular cells and promotes the accumulation of autoreactive antibodies and autoimmune disease. Secondly, a functional screening allowed us to identify a microRNA (miR-181b) that negatively regulates the isotype switch of antibodies by direct regulation of the Activation Induced Deaminase mRNA. Finally, we have found that miR-217, a microRNA differentially expressed in activated B cells, regulates the germinal center reaction and has pro-lymphomagenic potential. Together, our results show that microRNAs play crucial roles in the regulation of B cell function and B cell lymphomagenesis.

S1.2-2

Pleiotropic roles of Vav family oncoproteins in skin and oral tumorigenesis

Mauricio Menacho-Márquez y Xosé R. Bustelo
Centro de Investigación del Cáncer. CSIC-University of Salamanca, Salamanca

The Vav family is a group of oncogenic signal transduction molecules that work as activators of Rho/Rac GTPases. In mammals, this family has three members: Vav1, Vav2, and Vav3. Recent work has shown that these proteins play roles in a number of physiological processes, including immune responses and cardiovascular homeostasis. The use of *gain-of-function* mutants also demonstrated that they can promote tumorigenesis in cell culture. However, no evidence is yet available regarding the actual implication of Vav proteins on tumor development *in vivo*. To address this issue, we have used single and compound Vav family knockout animals in models of skin and oral tumorigenesis. Here, we will report that the endogenous Vav2 and Vav3 are important for the evolution of these two tumor types. We will also demonstrate that Vav proteins control signaling events critical for intrinsic keratinocyte survival and mitogenic pathways as well as for the engagement of extrinsic processes such as inflammation and angiogenesis. Interestingly, we have discovered that most Vav family-dependent biological processes are associated with the induction of paracrine loops involving mitogenic factors and cytokines. Finally, we will also show that the Vav family gene deficiency does not affect the homeostasis of normal epithelia, thus suggesting that anti-Vav family therapies will affect specifically tumors and not normal cells. Taken together, these data indicate that Vav proteins may represent good therapeutic targets for these tumor types.

S1.2-3

Retrotransposones regulados por AhR y Slug: aisladores genómicos en el control de la expresión génica

Ángel C. Román¹, Francisco J. González Rico¹, Eduardo Molto², Henar Hernando³, Ana Neto⁴, Cristina Vicente García², Esteban Ballestar³, José L. Gómez Skarmeta⁴, Jana Vavrova-Anderson⁵, Robert White⁵, Lluís Montoliu² y Pedro M. Fernández Salguero¹

¹Universidad de Extremadura, Badajoz, ²Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, ³Cancer Epigenetics and Biology Programme, Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, ⁴Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, ⁵Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow (UK)

Más de la mitad del genoma de la mayoría de los mamíferos está compuesto por secuencias repetitivas. Entre ellas, los retrotransposones SINE murinos (*Short Interspersed Nuclear Elements*) y *Alu* humanos incluyen gran parte de la fracción repetitiva del genoma de ambas especies. La abundancia y la conservación evolutiva de estos elementos apoyan su implicación en el mantenimiento de la estabilidad y de la función de los genes. Estudios recientes han mostrado algunas actividades sorprendentes de los elementos repetitivos, que incluyen, pero no están limitadas a la regulación transcripcional de la expresión génica y al control de la dinámica de la cromatina. En esta ponencia comentaremos sobre la caracterización de la actividad aisladora (*insulator/boundary*) de una nueva familia de retrotransposones murinos B1 (B1-X35S) ampliamente representados en el genoma de ratón. El efecto *insulator* de B1-X35S requiere no sólo de la participación de los factores de transcripción AhR (receptor de dioxina) y Slug/Snai2, sino también del recambio de la RNA polimerasa III por la RNA pol II sobre la secuencia del propio transposón. La presencia de B1-X35S en la región promotora de genes diana contribuye a la formación de una barrera de heterocromatina por acumulación de las marcas H3K9me3 y H3K27me3 y por el reclutamiento de las proteínas de *insulators* CTCF y PARP-1. La prevalencia de B1-X35S en el genoma de ratón (más de 14000 instancias) abre la excitante posibilidad de la existencia de una red reguladora en la cual los transposones con actividad *insulator* convierten señales biológicas en respuestas transcripcionales que definen dominios de expresión génica. Dicho mecanismo puede ser relevante en fisiología y su alteración puede subyacer a determinadas condiciones patológicas.

S1.3. Diferenciación celular en el cáncer

S1.3-1

Efectos de la vitamina D sobre la expresión génica y el fenotipo de células humanas de cáncer de colon

Alberto Muñoz, Óscar Aguilera, Silvia Álvarez-Díaz, Antonio Barbáchano, María Jesús Larriba, Fabio Pires, Gemma Ferrer y José Manuel González-Sancho

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid

La 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)2D3), el metabolito más activo de la vitamina D, es uno de los principales reguladores de la expresión génica en el organismo. La 1,25(OH)2D3 inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de células humanas de cáncer de colon. Nuestros resultados indican que estas acciones se deben, al menos en parte, al antagonismo de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, cuya activación aberrante es el paso inicial en cáncer colorrectal, por tres mecanismos: *a)* la unión de VDR a β -catenina, que impide la formación de complejos β -catenina-TCF y la activación de sus genes diana; *b)* la inducción de la expresión de CDH1/E-cadherina, que codifica una proteína esencial en la unión intercelular en epitelios supresora de invasividad y favorece la relocalización de β -catenina desde núcleo a la membrana plasmática; y *c)* la inducción de la expresión de DICKKOPF(DKK)-1, que codifica un inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina con actividad supresora tumoral. La deficiencia de VDR en ratones *Apcmin* que expresan una forma mutada del gen supresor *Apc* contribuye a la activación de la vía Wnt/ β -catenina y causa un aumento de la carga tumoral. La 1,25(OH)2D3 induce CST5/cistatina D, que codifica un inhibidor de proteasas con actividad antiproliferativa y antiinvasiva, y reprime SPROUTY-2, un modulador de la señalización por receptores tirosinaquinasa que favorece la tumorigénesis colorrectal. La regulación de E-cadherina, DKK-1, cistatina D y SPROUTY-2 debe contribuir al efecto protector de la 1,25(OH)2D3 en cáncer de colon.

S1.3-2

Notch y leucemias T: con el permiso de NF- κ B

Teresa D'Altri, Lluís Espinosa y Anna Bigas
IMIM-Hospital del Mar, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Barcelona

La hematopoyesis es el proceso que genera los distintos tipos de células sanguíneas durante la vida de un organismo. En el sistema hematopoyético, Notch interviene en la

formación de las células madre durante el desarrollo embrionario, sin embargo en la etapa adulta la función principal de Notch consiste en regular el desarrollo de los linfocitos T. En este sentido, ha sido claramente demostrado que la sobreactivación de Notch en precursores de linfocitos T induce la formación de leucemias agudas en ratón y en humanos. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en estas leucemias dependientes de la actividad Notch están todavía por clarificar. Nuestro grupo ha descrito diversas interacciones entre las vías de Notch y NF- κ B, y más concretamente su efecto sobre la transcripción del represor transcripcional *hes1*. Recientemente hemos demostrado que una nueva secuencia de señales que depende de la vía de Notch es imprescindible para la supervivencia de las células leucémicas de tipo T. Esta secuencia se inicia con la activación transcripcional de *hes1* por parte de Notch, que es responsable de la represión del gen *CYLD*. Esta deubiquitinasa es responsable de la desactivación del complejo IKK que a su vez activa al factor de transcripción NF- κ B. En presencia de *hes1*, *CYLD* está ausente y NF- κ B mantiene una activación constitutiva que permite la supervivencia de las células leucémicas. Este mecanismo influye además en la persistencia de las células iniciadoras de leucemias o células madre leucémicas.

S1.3-3

Chromatin and its impact on gene expression and cancer

Luciano Di Croce
CRG - Center for Genomic Regulation, Barcelona

The molecular basis of cancer is still poorly understood. In a context of genetic alterations, epigenetic events play a pivotal role in cancer development and progression. Among the chromatin/epigenetic enzymes, Polycomb group of proteins play a crucial role in regulating lineage choices during differentiation of stem cells and development. Additionally, they are implicated in cell proliferation, stem cell identity, cellular senescence, genomic imprinting, X-inactivation and hematopoiesis. Polycomb proteins are often misregulated in several types of cancer, suggesting that they play also a role in cancer formation. However the molecular mechanism regulating transcriptional silencing mediated by Polycomb proteins is not understood.

I will discuss the role of Polycomb complex and its regulation in the establishment and maintenance of gene silencing in mouse embryonic stem cells and during transformation.

Simposio 2: Señalización celular

Los resúmenes que optaban a alguno de los premios del XXXIV Congreso de la SEBBM llevan la correspondiente letra en su referencia: **e** (premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer), **m** (premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly) y **r** (premio Roche al mejor póster)

S2.1. Señalización y fisiología de la célula

S2.1-1

Regulación celular por la quinasa p38 MAPK

Ángel Rodríguez Nebreda
IRB Barcelona e ICREA, Barcelona

La quinasa p38 MAPK forma parte de una ruta de señalización que desempeña papeles muy importantes en las respuestas celulares a estrés e inflamación, pero también puede integrar señales que afectan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células, dependiendo del contexto y del tipo celular. Existen evidencias de que la ruta de p38 MAPK puede modular la formación de tumores a distintos niveles. Así, p38 MAPK normalmente inhibe la iniciación tumoral mediante la inducción de parada en el ciclo celular o apoptosis. Sin embargo, una vez que las células se han transformado, la ruta de señalización de p38 MAPK puede desempeñar otras funciones facilitando la proliferación, migración e invasión de las células tumorales. Nuestro grupo está utilizando ratones modificados genéticamente para investigar funciones *in vivo* de p38 MAPK y su papel en el desarrollo tumoral.

S2.1-2

Complex transcriptional response to toxic compounds in *Pseudomonas*

Juan L. Ramos¹, Sandy Fillet², Tino Krell¹, Ana M. Fernández¹, Duo Lu² y Xiadong Zhang²

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas - EEZ, Granada, ²Imperial College, London (UK)

Expression of the multidrug efflux pump *ttgDEF* and *ttgGHI* operons is modulated *in vivo* mainly by the TtgV repressor. TtgV is a multidrug recognition repressor that exhibits a DNA binding domain with a long interaction helix comprising residues 47 to 64. The pattern of expression of the two pumps is different in *Pseudomonas putida*: in the absence of effectors the promoter for the *ttgD* gene is silent whereas the *ttgG* gene is expressed at a high basal level. This correlates with the fact that TtgV exhibits higher affinity for the *ttgD* (KD=10±1nM) than for the *ttgG* (KD=19±1nM) operator. Sequence analysis revealed that both operators are 40% identical, and mutational analysis of the *ttgD* and *ttgG* operators combined with electrophoretic mobility shift assays and *in vivo* expression analysis suggest that TtgV recognizes an inverted repeats with a high degree of palindromicity around the central axis. TtgV binding to its target sequences provokes a convex DNA

bend. We generated a collection of alanine substitution mutants between residues 47 and 64 of TtgV. The results of an extensive combination of promoter variants with these TtgV alanine substitution mutants revealed that TtgV modulates expression from *ttgD* and *ttgG* promoters through the recognition of both common and different sequences in the two promoters.

S2.1-3

Regulation of the antioxidant response in neurons

Juan Pedro Bolaños
Universidad de Salamanca, Salamanca

The equilibrium between production and elimination of reactive oxygen species (ROS) regulates signaling processes and dictates cell death/survival fate. Neurons are highly vulnerable to bioenergetic failure and excess ROS; their survival is thought to exclusively rely on the protection exerted by neighboring astrocytes. However, neurons are intrinsically equipped with biochemical mechanisms coupling glucose metabolism to antioxidant defense response. Astrocytes remarkably obtains ATP preferentially by switching glycolysis on through a signaling mechanism involving AMP protein kinase (AMPK)-mediated activation of Pfkfb3 [1]. To maintain cytosolic NAD⁺, excess pyruvate is converted to lactate and released. Neurons take up lactate and oxidize it in mitochondria as the main energy fuel; neurotransmission and memory consolidation actually relies on astrocytic-derived lactate. Moreover, neurons continuously keep glycolysis inhibited; this occurs by continuously targeting Pfkfb3 for ubiquitination and degradation by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) and its protein adaptor Cdh1 [2]. Inhibition of Cdh1, or over-expressing Pfkfb3, switch glycolysis on and pentose-phosphate pathway off in neurons, leading to inefficient NADPH regeneration for glutathione reduction; this causes oxidative stress and neurodegeneration [3]. Thus, neurons maintains its antioxidant status by continuously inhibiting glycolysis, whereas their energy needs are met by metabolic coupling with neighboring astrocytes.

[1] Almeida et al. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 45-51. [2] Bolaños et al. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 145-9. [3] Herrero-Mendez et al. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 747-52.

S2.1-4

The transcriptional response to osmotic stress in yeast

Amparo Pascual-Ahuir, Fernando Martínez Montañés, Alessandro Rienzo y Markus Proft
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Valencia

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, osmotic stress causes profound adaptive changes affecting ion homeostasis at the plasma membrane, the regulation of the transition through the cell cycle, osmolyte production, prevention of oxidative damage, the modulation of translation efficiency and the massive reprogramming of gene expression in the nucleus. Here we will discuss recent findings to understand the molecular mechanisms underlying the transcriptional program operated upon osmotic stress in yeast. The main signal transduction pathway activated by osmotic stress is the HOG MAPK cascade. Its terminal MAPK Hog1 is rapidly activated upon stress and is responsible for the majority of the transcriptional changes. Hog1 acts through multiple specific transcription factors, such as Sko1, Hot1, Smp1, Msn2/4 and others to activate transcription upon stress. The genomic binding profiles of some of these factors reveals interesting differences: Sko1 is bound at many stress responsive promoters and regulates the expression of yet other transcription factors with potential functions in osmoadaptation. Hot1 binds and regulates a small and specific subset of stress genes related to the production of the osmolyte glycerol. Smp1 association with the genome is not specific for promoter regions but rather for the whole transcribed regions of stress-regulated genes. Other transcription factors such as Mot3 and Rox1 have specific functions upon osmotic stress where they adjust the sterol content by modulation of ergosterol biosynthesis genes. Finally we will present the use of a real time luciferase assay to describe quantitatively the behavior of different classes of stress-regulated promoters in yeast.

S.2.2. Señalización celular y desarrollo

S2.2-1

Cytoneme-mediated delivery of Hedgehog regulates the expression of bone morphogenetic proteins to maintain germline stem cells in *Drosophila*

Patricia Rojas Ríos¹, Isabel Guerrero² y Acaimo González-Reyes¹

¹Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC-UPO), Sevilla, ²Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Stem cells reside in specialised microenvironments, or niches, which often contain support cells that control stem cell maintenance and proliferation. Hedgehog (Hh) proteins mediate homeostasis in several adult niches, but a detailed understanding of Hh signalling in stem cell regulation is lacking. Studying the *Drosophila* female germline stem cell (GSC) niche, we show that Hh acts as a critical juxtacrine signal to maintain the normal GSC population of the ovary. Hh production in cap cells, a type of niche support cells, is regulated by the Engrailed transcription factor and Hh is secreted to a second, adjacent population of niche cells, the escort stem cells, where it activates transcription of the GSC essential factors Dpp and Gbb. In wild-type niches, Hh protein decorates short filopodia that originate in the support cap cells and that are functionally relevant, as they are required to maintain a normal population of GSCs. These filopodia, reminiscent of wing disc cytonemes, grow several fold in length if Hh signalling is impaired within the niche. Because these long cytonemes project directionally towards the signalling-deficient region, support cells sense and react to the strength of Hh pathway transduction in the niche. Thus, the GSC niche responds to insufficient Hh signalling by increasing the range of Hh spreading. Our results emphasise the integration of signals necessary to maintain a functional niche and the plasticity of cellular niches to respond to challenging physiological conditions.

S2.2-2

Función del proteasoma en la integración de la señal luminosa en plantas

Stella Bernardo, Miguel de Lucas, Jean-Michel Davière y Salomé Prat
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Los organismos vegetales han desarrollado complejos mecanismos de adaptación a su entorno que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Estas rutas de señalización responden en muchos casos a cambios en la longitud del día o calidad de luz, que sirven como sensores del transcurso de las estaciones del año o de la presencia de otras plantas competidoras y determinan el patrón de desarrollo del brote tras la germinación (fotomorfogénesis). Estos son percibidos por los receptores de luz roja o fitocromos que en su forma Pr inactiva se localizan en el citosol y en presencia de luz roja (R) son convertidos a la forma Pfr activa, de localización nuclear. En el núcleo, los phys interactúan con los factores *phytochrome interacting factor* (PIF) implicados en elongación celular, promueven la fosforilación de estos factores y su posterior degradación por el proteasoma. Mutantes deficientes en GAs o con un bloqueo en la ruta de señalización de estas hormonas, desarrollan un patrón de-etiolado en oscuridad. Hemos demostrado que dicho patrón obedece a una acumulación de las proteínas DELLA, un grupo de represores nucleares de la familia GRAS, degradados por el proteasoma en presencia de GAs. Estos represores se unen al dominio bHLH de los factores PIF, secuestrándolos en un complejo inactivo, incapaz de unirse al DNA. Así, el crecimiento del hipocotilo o tallo embrionario viene determinado por el balance entre los niveles de phyB, que marca los factores PIF para su degradación por el sistema proteasoma y el de los represores DELLA que forman un complejo inactivo con estos factores, en lugar de por una típica cascada de señalización génica.

S2.2-3

Sonic hedgehog regulates the neural stem character in the developing nervous system

Elisa Martí
Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona

In the early developing nervous system, neuroepithelial cells form a single-cell-layered pseudostratified epithelium that undergoes both proliferative (P-P) and neurogenic (P-N or N-N) cell divisions. Symmetric (P-P) and asymmetric (P-N) divisions coexist in the developing spinal cord. While symmetric divisions generate two progenitor stem cells that

maintain their polarized organization, asymmetric divisions generate migratory neuroblasts that lose epithelial polarity to initiate directional cell migration. The intrinsic mechanisms regulating cell division and the resulting fate of the mitotic progeny are just beginning to be understood. However, very little is known about the role of extrinsic signals controlling the balance between proliferative and differentiative divisions. We have previously demonstrated that Sonic hedgehog (Shh) activation is required upstream of Wnt canonical signalling to control the expression of key cell cycle regulators and thus to maintain neural progenitor proliferation. Here we have set forth the analysis of the consequence of Shh-activity on the maintenance of the balance between proliferative and differentiative divisions. We show that activation of the Shh pathway randomizes the orientation of the mitotic spindle and reduces the expression of the anti-proliferative gene *Tis21*, altogether resulting in the maintenance of neuroepithelial cells in a progenitor stem cell stage. Thus Shh is among the extrinsic signals controlling the balance between proliferative and differentiative divisions in the developing nervous system. Given the strong association of the Shh pathway with tumour formation, this finding might be relevant for cancer biology.

S2.3. Señalización y regulación genómica

S2.3-1

Análisis global de genes regulados por Pax8 en respuesta a cAMP: comunicación cruzada con las vías PI3K y Smads

Pilar Santisteban
Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid

El factor de transcripción Pax8 pertenece a la familia de genes con dominio *paired-box*. Se expresa en la célula epitelial tiroidea regulando genes de diferenciación como el gen del symportador de yodo (*NIS=Na/I Symporter*). Este gen está regulado transcripcionalmente por la hormona TSH, vía cAMP y por los factores IGF1, vía PI3K y TGFβ, vía Smads. En nuestro grupo hemos demostrado la existencia de una comunicación cruzada entre estas vías, de manera que las tres confluyen en la regulación del factor de transcripción Pax8. Así, TSH/cAMP induce la expresión de Pax8 y su unión al promotor/*enhancer* de NIS mientras que

IGF1/PI3K y TGF β /Smads impiden dicha unión. Hemos demostrado que TGF β induce la translocación de las proteínas Smads al núcleo donde forman complejos con Pax8 impidiendo la unión de este factor al DNA.

A pesar de que Pax8 juega un papel crucial en la diferenciación tiroidea, se conocen muy pocos genes regulados por dicho factor. Por ello hemos analizado los perfiles transcripcionales de células tiroideas controles o con Pax8 silenciado mediante RNAi. Los resultados los hemos integrados con los datos obtenidos de un análisis global de las secuencias en *cis* reguladas por Pax8 y obtenidas mediante ChIP-Seq. Tras análisis bioinformático hemos encontrado enriquecimiento de promotores asociados a islas CpG o a regiones ricas en secuencias GC, que representan dominios de cromatina transcripcionalmente activa. Hemos identificado proteínas que interactúan y coimmunoprecipitan con Pax8 como son CTCF y Sp1. La clasificación funcional de los genes identificados indica que están implicados en procesos importantes de la función tiroidea como proliferación, diferenciación, adhesión, polaridad y motilidad celular.

SAF2007-60164, BFU2010-16025 y RD06-0020-0060 (FIS).

S2.3-2

Progesterone signaling in gene regulation

Miguel Beato

CRG - Center for Genomic Regulation, Barcelona

Eukaryotic gene regulation requires access of transcription factors to DNA regulatory information stored and compacted in chromatin. Steroid hormones manage this challenge by receptor-mediated targeting of several protein kinases and histone modifying enzymes to their target genes in chromatin, where they cooperate with ATP-dependent chromatin remodelling complexes to catalyze the displacement first of linker histones and then of histone H2A/H2B dimers. In breast cancer cells treated with progestins, this process involves two consecutive cycles. During the first minute after hormone addition a ternary complex formed by the ligand-activated progesterone receptor (PR), and the activated kinases ERK1/2 and MSK1 phosphorylates histone H3 at S10 causing the displacement of a repressive complex including the histone demethylase PLU1/JARID1B/KDM5B, which is attached via HP1 γ to H3K9me3. The ternary complex recruits the complexes NURF and ASCOM (containing the histone lysine methylases MLL2 & MLL3). The resulting increase in H3K4me3 stabilizes the binding of NURF. In addition the activated ternary complex recruits cyclinA/CDK2, which in conjunction with the activated PARP1 is needed for displacement of the linker histone H1. The second cycle is

initiated 5 minutes after hormone addition by the recruitment of the histone acetyl transferase PCAF that acetylates histone H3 at K14, thus stabilizing the binding of the ATP-dependent chromatin remodelling complex BAF. BAF catalyzes the displacement of histone H2A/H2B dimers enabling access of further PR ternary complexes to hidden HREs, which is facilitated by binding of the ubiquitous transcription factor NF1. These two cycles are a prerequisite for the co-regulator mediated formation of the transcription initiation complex. Progestins also cause a general decompaction of chromatin that can be measured with biochemical methods and observed with advanced light microscopy. An attempt will be presented to integrate these new findings within a general model of the initial steps in hormonal gene regulation.

S2.3-3

Función de fosfoinosítido 3-quinasa en homeostasis del DNA y cáncer

Amit Kumar, Javier Redondo-Muñoz, Vicente Pérez-García, Susana Zuluaga y Ana C. Carrera
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Las fosfoinosítido 3-quinasas de clase IA (PI3K) son enzimas quiméricos compuestos por una subunidad reguladora p85 y una subunidad catalítica p110. Existen tres genes que codifican tres subunidades catalíticas distintas PIK3CA, CB y CD; de estas, las dos primeras son ubicuas y regulan división celular.

A pesar de que la función clásica de estas enzimas es convertir los fosfoinosítidos de membrana en formas polifosforiladas (en posición 3 del anillo de inositol), los datos que vamos a presentar se refieren al papel de la isoforma PIK3CB en el núcleo regulando la homeostasis del DNA. Esta función es esencial para la supervivencia celular y alteraciones en la misma están presentes en cáncer.

**Simposio 3:
El universo de las proteínas:
estructura y función**

Los resúmenes que optaban a alguno de los premios del XXXIV Congreso de la SEBBM llevan la correspondiente letra en su referencia: **e** (premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer), **m** (premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly) y **r** (premio Roche al mejor póster)

S.3.1 Análisis estructural, dinámica y acción de proteínas (Simposio Hispano-Luso)

S3.1-1

The structure solution of "Big Guys": X-ray diffraction and electron microscopy cooperation

Nuria Verdaguer Massana

Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Barcelona

Recent advances in methods for determining the structure of biological macromolecules, in particular those related to high throughput X-ray crystallography and NMR are offering an increasing number of structures solved at the atomic level. However, the correlation of these structures with defined functions is not well known, as most of these functions are carried out by macromolecular complexes, acting as biological nano-machines with a precise mechanism of control. Structural information on these complexes is essential to understand the molecular basis of the functioning of these machines, for example DNA transcription into messenger RNA, the translation of messenger RNA at the ribosome, the structural organization of the vault complex or the dynamic changes occurring in a viral capsid during infection. The limiting step for successful structural studies of many of these complexes is the production of homogeneous and stable samples for crystallisation. The incorporation of heterogeneous molecules would interfere in crystal growth, blocking the possibility of obtaining large or well diffracting crystals. An interesting approach for the study of non-crystallisable large multi-subunit assemblies is the three-dimensional cryo-electron microscopy (3D-cryo-EM). The combination of 3D-cryo-EM maps of large macromolecular complexes with X-ray structures of the individual components allows the construction of quasi-atomic resolution models of complete macromolecular assembly, which delineate the interactions between component proteins at the residue level, as well as conformational changes at the level of secondary structure elements. Different examples of the combined use of 3D-cryo-EM and X-ray crystallography will be presented.

S3.1-2

Dengue virus capsid protein translocates nucleic acids

João Miguel Freire¹, Ana Salomé Veiga², Wioleta Kowalczyk³, Ronaldo Mohana-Borges⁴, David Andreu³, Nuno C. Santos¹, Andrea T. Da Poian⁵ y Miguel Castanho¹

¹*Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa (Portugal)*, ²*Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (Portugal)*, ³*CCR/NCI, Chemical Biology Laboratory, MD (USA)*, ⁴*Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona*, ⁴*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil)*, ⁵*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil)*

Dengue virus (DENV), responsible for viral haemorrhagic fever and hypovolemic shock, infects 500 million people annually. The poor knowledge on DENV life cycle slows the development of novel therapies and, currently, no effective treatment is available. Results obtained both in vesicles and cells, suggest that C protein may have an active role in viral entry through the membranes of the endosomes. Our hypothesis is that C protein may collaborate with E protein in viral fusion and pore formation or translocate the ssRNA at the hemifusion step, suggesting that an exclusive involvement of the E protein in DENV fusion and entry may be an oversimplification. Two DENV C protein-derived peptides, containing the putative RNA- and membrane-binding domains, and the integral C protein were studied by fluorescence spectroscopy, confocal microscopy and light scattering techniques in the presence of lipid vesicles and cells. The results show that C protein has no specific RNA-binding domain, which agrees with an amorphous nucleocapsid. Both peptides have fusogenic and membrane translocation properties, revealing that C protein may participate in the viral membrane fusion and/or genome translocation processes. Co-localization of DENV C protein-derived peptides with oligonucleotides in the cytoplasm, including in the vicinity of the nucleus, suggests ssRNA transport to the translation site. Overall, this work reveals the ability that the capsid proteins of *Flaviviridae* may have in cellular infection, by helping membrane fusion and/or serving as natural transfection agents.

S3.1-3

Membrane sugar transporters: structure and function

Esteve Padrós¹, Yibin Lin¹, Oliver Fuerst¹, Meritxell Granell¹, Gérard Leblanc² y Víctor Lórenz-Fonfría¹
¹*Biophysics Unit, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Center for Biophysical Studies. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,* ²*Institut de Biologie et Technologies-Saclay, Service de Bioenergetique, Biologie Structurale et Mécanismes, CEA-Saclay, Gif sur Yvette (France)*

Secondary active transport driven by electrochemical ion gradients is a vital biological process present in all organisms. The melibiose transporter (MelB) of *E. coli* is a membrane protein representative of this class that co-transport galactosidic sugars with either Na⁺, Li⁺ or H⁺. α -galactosides such as melibiose are symported with either H⁺ or Na⁺, while β -galactosides like lactose are symported with Na⁺ but not with H⁺. MelB is proposed to consist of 12 transmembrane helices with the N- and C-terminal tails in the cytoplasmic face. During the transport steps, a fundamental conformational change is the reorientation of the substrates binding site between outward-facing and inward-facing conformations. By using mainly spectroscopic methods on MelB reconstituted into proteoliposomes, we present recent insights about structural and mechanistic aspects of MelB. Important side chains configuring the cation-binding site, as well as side chains involved in sugar binding are identified by combining mutagenesis with fluorescence and infrared difference spectroscopy. By using additional biochemical methods, essential side chains for the reorientation mechanism, and side chains involved in the maintenance of the correct structure of the substrates binding site are identified.

S3.1-4

Molecular mechanisms of ABC transporters: a simulation approach

Cláudio M. Soares, A. Sofia Oliveira, João M. Damas y António M. Baptista
Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa, Oeiras (Portugal)

ABC transporters are membrane proteins that couple the energy from ATP hydrolysis into transmembrane movement of substrates against the concentration gradient. Despite the large amount of structural and biochemical data available for this protein family, it is still not clear how the energy obtained from ATP hydrolysis in the ATPase domains is “transmitted” to the transmembrane domains. In this

presentation we will describe work done recently in our laboratory using MD simulation techniques, applied to NDB dimers [1,3] and full length transporters inserted into membranes [2,4]. Our studies, point at ATP-hydrolysis dependent conformational changes occurring in specific parts of the protein, namely in the helical subdomains, that are then transmitted to other parts of the transporter, changing the permeability characteristics of the channel. The mechanisms seem to be similar in importers and exporters, as expected from a largely common protein architecture. [1] Oliveira ASF, Baptista AM, Soares CM: “Insights into the ATP-hydrolysis mechanism of an ABC-transporter: conformational changes in the NBD dimer of MJ0796”. *J Phys Chem B* 2010; 114: 5486-96. [2] Oliveira ASF, Baptista AM, Soares CM: “Conformational changes induced by ATP-hydrolysis in an ABC transporter: a molecular dynamics study of the Sav1866 exporter”. *Proteins* 2011; 79: 1977-90. [3] Damas JM, Oliveira ASF, Baptista AM, Soares CM: (2011) “Structural consequences of ATP hydrolysis on the ABC transporter NBD dimer: molecular dynamics studies of HlyB”. *Prot Sci* 2011; 20: 1220-30. [4] Oliveira ASF, Baptista AM, Soares CM: “Inter-domain communication mechanisms in an ABC importer: a molecular dynamics study of the MalFGK2E complex”. *PLoS Comp Biol* 2010 (accepted).

S3.2. El universo de las proteínas a través de la genómica, proteómica y bioinformática

S3.2-1

Aplicaciones de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva al estudio de la relación genoma-proteoma

Samuel Martín, Sonia Tarazona, Rodrigo Lomas, Miguel Angel Pardo y Ana Conesa
Laboratorio Genómica de la Expresión Génica, Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, Valencia

El estudio del genoma está experimentando una nueva revolución gracias al desarrollo de las nuevas tecnologías de ultrasecuenciación o NGS por sus siglas en inglés *next generation sequencing*. NGS permite la generación de millones de lecturas cortas de secuencias de ácidos nucleicos en un solo experimento y está haciendo posible el

abordar nuevas cuestiones sobre la organización del genoma y avanzar en el concepto de medicina personalizada. En esta charla se da una visión de los logros de esta tecnología en desentrañar la complejidad de la expresión génica, sus mecanismos de regulación, la abundancia y diversidad del proteoma, la regulación a través de cambios epigenéticos y la identificación de mutaciones causante de enfermedades genéticas. Presentamos algunos de los avances recientes de mi grupo en el entendimiento de la organización y coordinación funcional del genoma utilizando NGS.

S3.2-2

Un *blazar* postraduccional redox en malaria

José M. Bautista, Amalia Díez y Antonio Puyet
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Madrid

La obligada digestión masiva de hemoglobina por parte del parásito de la malaria (*Plasmodium* spp.) durante el proceso invasivo del eritrocito huésped genera una elevada cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que favorecen la modificación oxidativa patológica de su entorno celular. La interacción entre parásito y hospedador ha conformado mecanismos de neutralización controlada de ROS y selección de polimorfismos adaptativos por parte de ambos organismos. Durante el proceso infectivo y también en su tratamiento farmacológico, el equilibrio redox puede verse desplazado y hacer más vulnerable al hospedador o bien al parásito. Por tanto, en la malaria, las ROS son una fuente de energía oxidante muy compacta y altamente variable, asociada al denso proceso invasivo parasitario y sobre la que gravitan muchos de los efectos patológicos, y es por ello por lo que la hemos definido como *blazar* postraduccional. El estudio de este fenómeno mediante proteómica redox nos ha permitido definir marcadores específicos de la patogenicidad de *Plasmodium falciparum* así como de su potencial vulnerabilidad. Además, estos análisis han desentrañado el daño oxidativo que sufren proteínas de membrana del eritrocito huésped durante la infección por *P. falciparum* y los posibles mecanismos protectores que operan a través de la selección de algunos polimorfismos genéticos en poblaciones humanas que habitan en regiones endémicas de malaria. Nuestras observaciones sugieren que *Plasmodium* spp. utiliza este *blazar* postraduccional para evadir la respuesta del hospedador y facilitar la invasión de la célula huésped pero también que el parásito es susceptible a las alteraciones en el equilibrio redox de su célula huésped y por tanto conlleva potenciales aplicaciones terapéuticas.

S3.2-3

Scoring the network of protein-protein interactions

Baldomero Oliva
UPF-PRBB, Barcelona

Proteins are the main perpetrators of most biological processes. However, they seldom act alone, and most cellular functions are carried out by large macromolecular complexes and regulated through intricate protein-protein interaction networks. With further interest on human health, protein interaction networks are a useful tool for characterizing diseases caused by malfunctions in genes or proteins and identifying novel cancer candidates with differential expression between the metastatic cells and their parental cells. Knowledge of the precise structures of macromolecules could provide insights about quantitative parameters or help to elucidate functional networks. Recent efforts to gain knowledge on the structure of protein-protein complexes have been tackled at high-throughput level. This leaves us with two different problems to solve: 1) individual protein-protein interactions for which we need to score the strength and to recognize how this is structurally build (solving the question of: *those WHO interact, HOW do they interact?*); and 2) the role of the proteins involved in a set of interactions (protein interaction network) and its functional implications (solving the question of: *those WHO interact, WHAT do they do?*). The first question tackles the problem of docking and strength between two interacting proteins. We have developed a set of statistic potentials to answer it. The second question refers to the problem of phenotype association scores and candidate disease-gene prioritization. We have developed three label-propagation algorithms that outperform state-of-the-art methods and applied to Alzheimer disease.

S3.3. Topografía proteica a nivel celular y tisular

S3.3-1

New approaches for on-tissue mass spectrometry-based mapping of peptides

Hugo Miguel Baptista Carreira dos Santos¹, Petri Kouvonen², Garry Corthals² y José-Luis Capelo-Martínez³

¹*UAB, Barcelona. IBB-CGB-UTAD. REQUIMTE-CQFB, FCT-UNL, Monte de Caparica, Caparica (Portugal)*, ²*Turku Centre for Biotechnology, University of Turku & Åbo Akademi University, Turku (Finland)*, ³*Department of Physical Chemistry at Ourense Campus, Faculty of Science at Ourense Campus, University of Vigo, Ourense*

When applied to a sample as complex as a tissue, laser energy promotes the formation of a plume of molecules including, but not limited to, peptides and proteins. This remarkable yet facile event has led to the emergence of a new field of MALDI MS, termed MALDI imaging MS, which now allows the simultaneous analysis of the distributions of up to hundreds of peptides and proteins directly from a tissue section or tissue array. Typically the technique relies on masses of the peptides and proteins to distinguish between different species and thus does not require any form of labelling. Despite the relative ease to generate reproducible ion intensity images, ions reaching the detector are not always readily assigned to a given type of molecule. In particular for peptides, it is not always possible to unequivocally determine what a peptide ion is based on its isotope distribution. In the present work we report a new method for the direct in situ labelling of tissue peptides. The method enables in a fast, simple and reproducible manner the unequivocal assignment of tissue-embedded peptide ions from other ions, based on the 'mixed isotope' pattern due to the labelling present in the peptides.

S3.3-2

Fotoproteínas trazadoras para imagen no invasiva en terapia celular

Nuria Rubio Vidal
Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Barcelona

La luz visible puede penetrar alrededor de 1 cm a través de los tejidos y permite explorar el comportamiento de poblaciones celulares en el interior de animales pequeños.

En la naturaleza existe gran variedad de fotoproteínas capaces de producir luz visible, a través de dos mecanismos: fluorescencia y bioluminiscencia, no obstante, solo algunas se han utilizado en la investigación biológica. El prototipo de la primera de estas proteínas, la proteína verde fluorescente, se clonó de la medusa *Aequoreavictoria* y emite luz verde de 509 nm, cuando se excita con luz de 395 nm. El prototipo de proteína bioluminiscente, luciferasa, se clonó de la luciérnaga *Photinuspyralis* y genera fotones de 550nm como producto de la reacción con su sustrato (luciferina) en presencia de ATP, iones Mg y oxígeno molecular. La introducción de estos genes en células eucarióticas, mediante el uso de vectores de expresión, permite el seguimiento de las mismas una vez implantadas en animales de experimentación, de modo no invasivo y longitudinalmente. El grupo aplica esta metodología en dos ámbitos de actuación: 1) *Medicina regenerativa*: El objetivo es el estudio de la interacción entre células y biomateriales, implantados en animales vivos, para la regeneración tisular. Se ha generado una plataforma de análisis que permite el estudio comparativo y rápido de series de biomateriales, con el fin de seleccionar el más adecuado. 2) *Citoterapia antitumoral*: El objetivo es desarrollar terapias antitumorales basadas en el uso de células progenitoras, con tropismo por los tumores, como vehículos portadores de un gen citotóxico (timidina quinasa), que transforma un profármaco no tóxico en un compuesto capaz de producir muerte celular en la proximidad de las células tumorales, con gran efectividad.

S3.3-3

Cartografía de la infección del virus *Vaccinia* a través de criotomografía de rayos X

Francisco Javier Chichón¹, María Josefa Rodríguez¹, Eva Pereiro², Michele Chiappi¹, Mariano Esteban¹, Peter Guttmann³, Gerd Schneider³ y José L. Carrascosa¹

¹*Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid*, ²*ALBA Synchrotron Light Facility, Cerdanyola del Vallès*, ³*Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH, Elektronenspeicherring BESSY II, Berlin (Germany)*

La aparición de la criotomografía mediante microscopía electrónica ha permitido la obtención de volúmenes tridimensionales celulares a una resolución de unos nanómetros mediante la utilización de métodos de criopreservación. La poca penetración de los electrones en la materia orgánica ha limitado el estudio de la estructura celular a secciones o muestras purificadas de no más de 500

nm de grosor. El abordaje complementario que permite superar dicha limitación en el estudio de la estructura celular en 3D es el uso de la microscopía de rayos X. Las características de absorción de los rayos X permiten trabajar a una energía a la cual el agua no absorbe. La combinación de nuevas lentes microfabricadas (*zone plates*) con pequeñas aperturas numéricas, la posibilidad de obtener imágenes con un gran contraste debido a la llamada “ventana del agua” sin la adición de agentes de tinción y la alta penetración de los rayos X en la materia orgánica dibujan un entorno especialmente adecuado para el estudio de la cartografía celular. En este trabajo hemos usado células PtK2 infectadas con el virus *Vaccinia* modificado para producir GFP a lo largo de la infección con el fin de obtener una visión global en 3D de la reorganización celular de orgánulos y la posición de los virus. Nuestras reconstrucciones tomográficas sugieren un flujo de maduración del virus desde la zona perinuclear, rodeada de mitocondrias, hasta la membrana plasmática. La utilización de péptidos clonables, con capacidad para precipitar metales pesados, permitirá en un futuro la localización de proteínas en el entorno celular más allá de la resolución nominal de la técnica.

Reuniones de grupo

Los resúmenes que optaban a alguno de los premios del XXXIV Congreso de la SEBBM llevan la correspondiente letra en su referencia: **e** (premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer), **m** (premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly) y **r** (premio Roche al mejor póster)

R01. Apoptosis

R01-1

Apoptosis típica y atípica inducida por inhibición del metabolismo glicolítico

Silvia Ramírez-Peinado, Alfredo Caro-Maldonado, Fermín Alcázar-Limones, Laura Lagares-Tena, Nadia El Mjijad, Oscar Martínez Tirado y Cristina Muñoz-Pinedo

Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet, Barcelona

Las células tumorales presentan un metabolismo glicolítico alterado. Por esta razón, se está planteando el uso de inhibidores de la glicólisis como nueva terapia antitumoral. Sin embargo, sabemos muy poco sobre cómo la inhibición del metabolismo de la glucosa provoca la muerte de las células tumorales. Hemos analizado el proceso de muerte inducido por la retirada de glucosa o por el tratamiento con 2-deoxiglucosa. La privación de glucosa mata a las células tumorales por apoptosis mitocondrial o por necrosis. Sin embargo, hemos encontrado un nuevo mecanismo de muerte que se produce en células HeLa o en fibroblastos deficientes en Bax y Bak. Esta forma de apoptosis "atípica" depende de la caspasa-8 pero no de la interacción de ligandos y receptores de muerte. Por otra parte, estudiamos el mecanismo de muerte inducido por 2-deoxiglucosa en rabdomiosarcomas. La 2-deoxiglucosa (2-DG) es un análogo de la glucosa no metabolizable. En estas células, la 2-DG induce apoptosis, mientras que la falta de glucosa induce necrosis. Demostramos que la apoptosis depende de la ruta mitocondrial y está controlada por el eje Mcl-1/Noxa. Sorprendentemente, la apoptosis está asociada con el estrés del retículo endoplásmico producido por la 2-deoxiglucosa, y no por la inhibición de la síntesis de ATP. Discutiremos la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en el contexto de la inhibición del metabolismo energético.

R01-2

Potencial terapéutico de las células NK humanas en el tratamiento de neoplasias hematológicas resistentes a protocolos clásicos de quimioterapia

Diego Sánchez-Martínez¹ y Julián Pardo²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²ARAID, Fundación Aragón I+D, Gobierno de Aragón, Zaragoza

Recientemente, se ha descrito diferentes tipos de neoplasias hematológicas son sensibles a células NK alogénicas, a pesar de tener una alta expresión de MHC-I. Esto se debe a que los receptores de inhibición de las células NK (KIR) no se unen a los MHC-I alogénicos. Sin embargo, se desconocen los mecanismos apoptóticos a través de los cuales estas células malignas son eliminadas. Para estudiar estos mecanismos, hemos comparado el potencial citotóxico de células NK aisladas *ex vivo* procedentes de donantes sanos con células NK expandidas *in vitro* del mismo donante, contra líneas celulares de mieloma múltiple y leucemia. Asimismo se han utilizado mutantes de estas líneas que sobreexpresan o carecen, respectivamente, de proteínas anti- (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) o pro-apoptóticas (Bak, Bax, Bim) y que son relativamente resistentes a drogas de quimioterapia como doxorubicina, dexametasona, bortezomib o vincristina. Nuestros datos muestran que las células NK *ex vivo* son capaces de inducir apoptosis en las diferentes células diana. Sin embargo, la activación *in vitro* aumenta en gran proporción su capacidad de matar a las células diana, consiguiendo evadir los mecanismos anti-apoptóticos de protección frente a otros estímulos clásicos. La muerte celular inducida por estas células NK depende del sistema perforina-granzimas, aunque únicamente la expresión de granzima B aumenta significativamente durante la activación. En estos momentos estamos empezando a analizar la capacidad de estas células NK para eliminar células de pacientes con diferentes tipos de neoplasias hematológicas. De este modo se pretenden establecer las bases moleculares para nuevos tratamientos basados en células NK alogénicas, que sean capaces de eliminar células tumorales resistentes a los tratamientos actuales.

R01-3

Endonucleasa G desempeña funciones importantes en la vida y la muerte del miocardio

Junmei Ye¹, Chris McDermott-Roe², Anna Serafin³, Elena García-Arumi⁴, Ramón Martí⁴, María Cardona¹, Marisol Ruiz-Meana⁵, David García-Dorado⁵, Xavier Cañas³, Joan Comella⁶, Stuart Cook² y Daniel Sanchis¹

¹IRBLLEIDA - Universitat de Lleida, Lleida, ²Medical Research Council Clinical Sciences Centre, Faculty of Medicine, Imperial College London, London (UK),

³Platform of Applied Research on Laboratory Animal Barcelona Science Park, Barcelona, ⁴Unitat de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca Vall Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, ⁵Grup de Patologia

Cardiovascular, Institut de Recerca Vall Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, ⁶CIBERNED - Institut de Recerca Vall Hebron - Dept Bioquímica i Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

Endonucleasa G (EndoG) es una DNA/RNasa mitocondrial descubierta hace casi tres décadas en extractos de corazón. A su posible papel en la replicación del DNA mitocondrial (DNAm) se le añadió posteriormente la implicación en la fragmentación del DNA nuclear dentro del proceso de muerte celular independiente de caspasas. Sin embargo, su función fisiológica está por determinar y su rol en el proceso de muerte celular quedó cuestionado por la falta aparente de fenotipo del ratón knock out. Nuestros resultados previos indican que el corazón del embrión expresa los principales genes reguladores de la muerte dependiente de caspasas, pero estos genes son silenciados durante la diferenciación postnatal. Los resultados presentados aquí indican que, contrariamente a los genes apoptóticos, EndoG es más abundante en el miocardio diferenciado. Durante la isquemia, la proteína BH3-only Bnip3 induce la salida de EndoG de las mitocondrias de los miocitos y ésta degrada el DNA nuclear sin la implicación de caspasas pero de forma detectable por la técnica de TUNEL (que ha sido utilizada indiscriminadamente como indicador de muerte dependiente de caspasas). En condiciones normales, la ausencia de EndoG induce el crecimiento anormal de los miocitos, tanto in vitro como in vivo, acompañado de la disminución en el número de copias de DNAm, menor cantidad de mitocondrias, reducción en la capacidad respiratoria mitocondrial, aumento en la producción de radicales libres y alteración en el metabolismo lipídico del tejido cardíaco, sugiriendo que EndoG tiene una función importante en la fisiología del corazón. Por lo tanto nuestros resultados muestran que EndoG está implicada de forma relevante tanto en el metabolismo cardíaco como en el proceso de muerte de los cardiomiocitos.

Laboratorio 3D, Madrid, ²Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid, ³Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, ⁴Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

La muerte celular programada es un proceso fisiológico fundamental para el desarrollo de la retina que afecta a todos los tipos celulares. Sin embargo, el proceso subyacente a la muerte de neuronas recién diferenciadas aún no ha sido establecido. Algunos ratones genéticamente modificados con deficiencias en el sistema de reparación de roturas de DNA presentan un efecto dramático en el desarrollo temprano del sistema nervioso central, lo que sugiere la implicación esta vía en el desarrollo neural. Así pues, intentamos demostrar in vivo la necesidad de la reparación de roturas de DNA de doble hebra para la correcta neurogénesis de la retina.

Para ello, analizamos la retina embrionaria de SCID y Pol mu, dos modelos murinos mutantes para el sistema de reparación del DNA de doble hebra. Para determinar el efecto de las mutaciones en los procesos de reparación del DNA, diferenciación neuronal, axonogénesis y muerte celular analizamos retinas disociadas y montadas en plano por medio de inmunohistoquímica y técnica TUNEL.

Los mutantes SCID y Pol mu presentan alteraciones en la capacidad de reparación del DNA y un aumento de la apoptosis en la retina que afecta selectivamente a células ganglionares jóvenes. Adicionalmente, el patrón de crecimiento axonal en la retina y el nervio óptico también se ven afectados.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la gestión adecuada de la generación y reparación de roturas de DNA de doble hebra durante la neurogénesis de la retina es imprescindible para conseguir un desarrollo retiniano correcto. Más aún, las roturas de DNA de doble hebra podrían ser el mecanismo subyacente a la muerte neural temprana.

R01-4

Reparación de roturas de DNA de doble hebra: implicación de la vía de reparación no homóloga en el desarrollo de la retina

Noemí L. Álvarez Lindo¹, Jimena Baleriola Gómez de Pablos¹, Jose Luis Martínez San-Martín¹, Gloria Terrados², Beatriz Escudero³, Antonio Bernad³, Luis Blanco⁴, Teresa Suárez¹ y Enrique De la Rosa¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Departamento de Biología Molecular y Celular.

R01-5

La sensibilidad a paclitaxel en células de cáncer de mama requiere una parada eficiente en mitosis y la ruptura de la interacción Bcl-xL/Bak

M. Luz Flores de Mera¹, Carolina Castilla Ramírez¹, Rainiero Ávila Polo¹, Béatrice Marquez-Garrido¹, Manuel Ruiz-Borrego², Carmen Sáez Torres¹ y Miguel Á. Japón Rodríguez¹

¹Instituto de Biomedicina (IBiS) y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, ²Unidad de Oncología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

El paclitaxel es un antimitótico perteneciente al grupo de los taxanos que, en la actualidad, se usa para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, las células tumorales pueden desarrollar resistencia a esta droga, lo que produce la recurrencia de la enfermedad. En este estudio, evaluamos el efecto del paclitaxel sobre apoptosis, ciclo celular y familia de proteínas Bcl-2 en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y T-47D) para hallar posibles mecanismos de resistencia a este taxano, así como la posibilidad de incrementar la apoptosis que induce el paclitaxel, combinándolo con feniletil-isotiocianato (PEITC). Las células T-47D mostraron gran sensibilidad a paclitaxel, la apoptosis se asocia con ruptura de la interacción Bcl-xL/Bak y parada robusta en mitosis. Por el contrario, las células MDA-MB-231 eran insensibles a la droga, la resistencia se asocia con el mantenimiento de la interacción Bcl-xL/Bak tras el tratamiento con paclitaxel y con un alto porcentaje de células que escapan de la parada en mitosis inducida por el paclitaxel mediante deslizamiento o slippage. En células MDA-MB-231, el tratamiento secuencial PEITC seguido de paclitaxel disminuye el porcentaje de células que escapan de mitosis e incrementa la apoptosis inducida por cualquiera de las drogas solas, mientras que este efecto no se observa en células T-47D. Así, la combinación de una droga que induce parada robusta en mitosis (paclitaxel) con otra que inhibe el deslizamiento (PEITC), se traduce en un aumento de la apoptosis en células de mama resistentes a paclitaxel. Finalmente, la expresión alta de Bcl-xL en tumores de mama correlaciona estadísticamente con una supervivencia libre de enfermedad más corta en pacientes tratados con un régimen quimioterápico que incluye paclitaxel.

R01-6

PINK1: The *mito-guard* after the damage by CCCP

Rubén Gómez-Sánchez¹, Matt Gegg², José Manuel Bravo-San Pedro¹, Mireia Niso-Santano¹, Elisa Pizarro-Estrella¹, Rafael Gamero-Negrón¹, Rosa Ana González-Polo¹, José Manuel Fuentes¹ y Anthony H Schapira²

¹CIBER sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura, E. Enfermería y Terapia Ocupacional, Cáceres,

²Department of Clinical Neurosciences, Institute of Neurology, University College London, London (UK)

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by symptoms related to movement, as shaking, rigidity or slowness of movement. The motor alterations are because of the dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra (midbrain). Its etiology is unknown and

is composed by genetic and environmental factors. It has been shown that patients with PD have mitochondrial dysfunction and mutations in the mtDNA, which could contribute in the development of the disease.

One of the genes related to PD is PARK6, which codifies the PINK1 protein, and its mutations are the second most common cause of autosomal recessive PD. PINK1 is partly localizes to the mitochondria and has been shown to play a major role in protecting neuronal cells from oxidative stress and cell death, mostly interacting with other proteins to maintain the mitochondrial morphology and function. In this study, we observed that PINK1 is recruited to the mitochondria after carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) treatment in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), which is basically due to a higher expression of PINK1, and not to the protein stabilization. In this sense, we have shown that CCCP produces dissipation of mitochondrial membrane potential and intracellular Ca²⁺ elevation. These results suggest a possible role of PINK1 in damaged mitochondria and could be the key protein in neuroprotective pathways through Ca²⁺ signalling.

Note: The funding was from Junta de Extremadura (PRIS10013 and GR10054); Instituto de Salud Carlos III (CB06/05/0041 and CP080010) and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-14993); Wellcome Trust/MRC Joint Call in Neurodegeneration award (WT089698) to the UK Parkinson's Disease Consortium (UKPDC); Fondo Social Europeo.

R01-7

Actinomycin D-mediated intracellular microRNA environment alteration and sensitization towards TRAIL-induced cell death in U87MG human-derived glioblastoma cells

Estel Gil-Guiñón¹, Irene Casanova-Salas¹, Laura Teixidó², Victoria Iglesias-Guimaraes¹, Elisenda Casanelles¹, María Sánchez-Osuna¹, Mercè Garcia-Belinchón¹, Mònica Jara² y Victor J. Yuste¹

¹Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²AbBcn S.L., Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

Glioblastoma multiforme (GBM) represents about 20% of intracranial neoplasms, and 50% of the entire gliomas. Due to its high invasiveness and proliferation rates, GBM is one of the most aggressive forms of cancer. Prognosis is highly adverse: if untreated, life expectancy is less than 6 months after diagnosis, and 12-18 months after extreme surgery and

chemotherapy. Only 10% of patients survive over 2 years. One of the most promising treatments against cancer is apoptosis induction through activation of death receptors, through administration of either their soluble ligands or humanized monoclonal antibodies. In the case of GBM, the use of TRAIL or derivatives is envisaged as one of the most promising therapeutic approaches. However, a non-negligible number of GBM-derived cell lines are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. We proposed that the elucidation of microRNA (miRNA) expression patterns, and its relationship with the resistance/invasiveness of GBM to TRAIL-mediated cytotoxicity, could constitute one of the most amazing tools for a better comprehension of GBM behavior. Therefore, we studied miRNAs expression in U87MG GBM-derived human cells in the absence or in the presence of ActD and/or TRAIL. Taking advantage of *Agilent's microarrays*, where 723 human miRNAs are represented, we have revealed different miRNA expression profiles associated to ActD, TRAIL or a combination of both. These results point out that the study of those miRNAs controlling the biological actions of TRAIL will provide new data for future diagnostic, prognostic or even therapeutic strategies, at least against GBM. *Note:* Supported by MICINN (TRA2009-0185 grant) and AGAUR, Generalitat de Catalunya (*Grups consolidats*, 2009-SGR346).

R02. Bases Moleculares de la Patología

R02-1

Activation of LKB1-Akt pathway independent of PI3 Kinase plays a critical role in the development of hepatocellular carcinoma from NASH

Maria Luz Martinez Chantar

Metabolomics Unit, CIC bioGUNE, CiberEHD, Parque Tecnológico de Vizcaya Edif 801A, Derio

Background & Aims: LKB1, originally considered as a tumor suppressor, plays an important role in hepatocyte proliferation and liver regeneration. Mice lacking *Methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A)* gene show chronic reduction in hepatic SAME levels, basal activation of LKB1 and spontaneously develop non alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma (HCC). These results are relevant for human health since patients with liver cirrhosis, who are at risk to develop

HCC, have a marked reduction in hepatic MAT1A expression and SAME synthesis. In our current work we have isolated a cell line, SAME-D (SAME-Deficient) from the HCC of MAT1A-KO mice to examine the role of LKB1 in the development of liver tumors derived from metabolic disorders. **Results:** We find that LKB1 is required for cell survival in SAME-D cells. LKB1 regulates Akt-mediated survival, independently of PI3K, AMPK and mTORC2. In addition, LKB1 controls the apoptotic response through phosphorylation and retention of p53 in the cytoplasm, and the regulation of HAUSP and HuR nucleo-cytoplasmic shuttling. We identify HAUSP as a target of HuR. Finally, we observed cytoplasmic staining of p53 and pLKB1 (Ser428) in a NASH-HCC animal model (MAT1A-KO) and in liver biopsies obtained from human HCC derived from both (alcoholic steatohepatitis) ASH and NASH etiology. **Conclusion:** SAME-D cell line is a unique model of HCC derived from NASH disease where LKB1 is the principal conductor of a new regulatory mechanism and can be considered as an excellent tool to uncover new therapeutic strategies.

R02-2

Función de la neuregulina 1 y su receptor ErbB4 en la formación de los circuitos GABAérgicos: etiología de la esquizofrenia

Beatriz Rico

Instituto de Neurociencias, CSIC-Universidad Miguel Hernández, Alicante

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica severa que afecta a un 1% de la población mundial. Aunque se desconoce de forma precisa la fisiopatología de la enfermedad, en los últimos años se ha sugerido que puede producirse como consecuencia de una alteración del desarrollo del sistema inhibitorio cortical. Diferentes estudios genéticos han identificado en los últimos años a la neuregulina-1 (NRG1) y su receptor ErbB4 como posibles genes candidatos cuya alteración podría aumentar la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Utilizando como modelo el ratón, nuestro laboratorio ha demostrado por primera vez que la pérdida de función del receptor ErbB4 o la ganancia de función de su ligando Neuregulina-1 altera estructural y funcionalmente los circuitos GABAérgicos (inhibitorios) corticales de forma exclusiva. En concreto, ErbB4 es necesario tanto para la formación de una población específica de sinapsis inhibitorias sobre neuronas piramidales como para el desarrollo de sinapsis excitadoras sobre clases específicas de interneurons.

R02-3

c-Raf, pieza esencial en la iniciación de adenocarcinomas de pulmón promovidos por K-RasG12V

Rafael B. Blasco¹, Sarah Francoz¹, David Santamaría¹, Marta Cañamero², Pierre Dubus³, Manuela Baccarini⁴ y Mariano Barbacid²

¹Programa de Oncología Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid,

²Programa de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid,

³EA2406 Universidad de Burdeos 2, Burdeos

(Francia), ⁴Centro de Biología Molecular, Universidad de Viena, Laboratorios Max F. Perutz, Viena (Austria)

K-RAS se encuentra mutado en un 30% de los adenocarcinomas de pulmón. Al no haber podido desarrollarse terapias frente a esta oncoproteína, los intentos actuales van dirigidos a bloquear sus vías efectoras. Nosotros nos focalizamos en la vía Erk-Mapk y en investigar qué papel juega cada uno de sus miembros en la iniciación de adenocarcinomas de pulmón, los cuales eran inducidos en ratones mediante la expresión de una forma oncogénica de K-Ras, K-Ras^{G12V}. La eliminación de Erk1 o Erk2, en células que expresaban esta forma oncogénica, no afectaba a la iniciación tumoral debido a la compensación entre ambas isoformas. Sin embargo, la eliminación de ambas quinasas Erk impedía la aparición de estos tumores. Desafortunadamente, la eliminación sistémica de Erk1/2 provocaba la muerte de los animales adultos en menos de 4 semanas. Similares resultados se obtuvieron para las quinasas Mek. Por otro lado, no se observó compensación entre las quinasas Raf. Mientras que la eliminación de B-Raf no tenía consecuencias en el desarrollo de los tumores de pulmón, la expresión de c-Raf era esencial para la aparición de los mismos. Además, la eliminación sistémica de c-Raf, así como de c-Raf y B-Raf conjuntamente, no conllevaba efectos deletéreos para la homeostasis de animales adultos. Estos resultados indican que c-Raf juega un papel imprescindible en la oncogénesis inducida por K-Ras en el pulmón, con lo que podría ser una diana para el desarrollo de terapias antitumorales. Para poder validar este concepto, estamos estudiando cómo afecta la eliminación de c-Raf a la progresión de tumores de pulmón, los cuales fueron inducidos por la previa expresión de K-Ras^{G12V} y monitorizados mediante TAC.

R02m-4

Estudio de la función del coactivador transcripcional PGC-1β en tejido adiposo blanco

Natalia Enguix¹, Rosario Pardo¹, Anastasia Kralli² y Josep A. Villena¹

¹Vall d'Hebron-Institut de Recerca, Barcelona, ²The Scripps Research Institute, La Jolla (USA)

La resistencia a insulina y la diabetes de tipo 2 son condiciones patológicas caracterizadas por una disminución de la masa mitocondrial en tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco (TAB). Esta disminución de la masa y función mitocondriales se correlaciona con bajos niveles de PGC-1α y PGC-1β, por lo que se ha sugerido que estos coactivadores transcripcionales podrían jugar un papel relevante en el desarrollo de estas patologías. Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la ausencia de PGC-1α en TAB no solo no afecta la biogénesis mitocondrial sino que tampoco es suficiente para inducir resistencia a insulina. Con el fin de estudiar la función de PGC-1β en el TAB y su posible implicación en el desarrollo de enfermedades metabólicas, hemos generado un ratón *knockout* tejido-específico en el que el gen *Pparg1b* ha sido inactivado exclusivamente en tejido adiposo (ratones PGC1β-FAT-KO). El análisis del perfil de expresión génica del TAB de ratones PGC1β-FAT-KO mediante el uso de *microarrays* de ADN revela que PGC-1β regula mayoritariamente la expresión de genes mitocondriales OxPhos y del ciclo de Krebs. La disminución de la expresión de genes mitocondriales en TAB de ratones PGC1β-FAT-KO se correlaciona además con una disminución de los niveles de proteína de los complejos OxPhos y de la función oxidativa mitocondrial. A pesar de la disfunción mitocondrial, los ratones PGC1β-FAT-KO no desarrollan intolerancia a la glucosa o resistencia a insulina. Los resultados obtenidos permiten establecer el papel clave de PGC-1β en la regulación de la expresión de genes mitocondriales en TAB, y sugieren que la disminución de la función mitocondrial en TAB no es suficiente para inducir resistencia a insulina en ratones.

R02r-5

Caracterización de un nuevo modelo animal de degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

Esther Zurita¹, Laura Ramírez², Almudena Fernández³, Marta Cantero¹, Anna González-Neira⁴, Guillermo Pita⁴, Javier Benítez⁴, Pedro de la Villa² y Lluís Montoliu¹

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid,
²Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, ³CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid,
⁴CEGEN-Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid

Durante la caracterización del fenotipo visual de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, utilizados para la generación de ratones transgénicos, descubrimos individuos con un electroretinograma (ERG) alterado, con una carencia de señales eléctricas de la retina asociadas a conos, lo cual sugería una desaparición significativa de este tipo de fotorreceptores. Investigaciones posteriores, mediante preparaciones de retina y tinciones específicas de conos, corroboraron que, efectivamente, los ratones que presentaban una señal eléctrica débil de conos y un menor índice de visión (menor agudeza visual) en el test optomotor coincidían con aquellos individuos que tenían menos conos en su retina. A partir de microfotografías obtenidas al microscopio electrónico de células del epitelio pigmentado de la retina (RPE) de estos animales, pudimos descubrir acúmulos de material dismórfico, restos de membranas, drusen y depósitos hialinos muy similares a los descritos para otros modelos animales de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la causa mayoritaria de ceguera en personas de más de 60 años. Con objeto de caracterizar el locus implicado en este nuevo modelo animal hemos abordado un análisis genético de ligamiento, usando la plataforma Illumina del CEGEN-CNIO de Madrid, a partir de un centenar de animales fenotipados, distribuidos en ocho pedigrís parcialmente independientes. Los análisis bioinformáticos posteriores de la cosegregación de polimorfismos genéticos específicos (SNP) con el fenotipo mutante nos ha permitido acotar la región del genoma portadora del locus cuya mutación causa dicha alteración.

R03. Biología del Desarrollo

R03-1

Dynamic coordination of cell behavior during morphogenesis

Enrique Martín-Blanco, Philippe-Alexander Pouille, Carla Prat-Rojo, Sofia Cabral, Amayra Hernández-Vega, Maria Marsal y Javier Buceta
Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), CSIC, Barcelona

To understand the principles that govern the development of an organism, producing enough cells, making them

different and organizing them in space and time, is all a problem of information processing. We are interested in the analysis of the properties associated to cell motility during development applying quantitative measurements and data integration. In biological terms, we are using the *Drosophila* histoblasts and the epiboly of the Zebrafish embryo as models. Histoblasts are the founder cells of the *Drosophila* adult abdominal epidermis. We have found that histoblasts remain dormant during larval stages and become invasive during metamorphosis. At this stage, histoblasts acquire differential cellular plasticity and motility in response to paracrine signals. Remarkably, their proliferation and expansion are coordinated with the apoptosis of the surrounding obsolete larval epithelial cells. We are applying particle velocimetry analysis and cell tracking to detect and interpret the mechanical forces employed in the coordinated and patterned growth of the tissue. Finally, we are trying to elucidate which signaling pathways diversify this population of cells into the abdominal epidermis and also other cell types such as bristles and neurons, oenocytes and abdominal tendon cells. Similar analyses have been also applied to epiboly in Zebrafish. We are studying the role of endocytosis, cell cytoskeleton dynamics and yolk internal flows and how they are modulated by different signaling cascades during the coordination of the expansion of different layers as morphogenesis proceeds. We are also establishing individual-based dynamical vertex models describing cell movement and domain growth and mechanisms and models able to map force transmission at the tissue level.

R03-2

Supervivencia celular y neurogénesis en el desarrollo del oído interno

Isabel Varela Nieto y María R. Aburto
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CIBERER, Madrid

Las neuronas óticas y las células sensoriales se forman a partir de precursores comunes cuya transición a células auditivas maduras requiere de la exquisita coordinación de programas de supervivencia celular, proliferación y diferenciación. Los factores tróficos que apoyan la supervivencia neuronal durante la etapa tardía de diferenciación se han estudiado con detalle, pero no se conocen suficientemente las señales que regulan la supervivencia de las células progenitoras neurales. Hemos demostrado recientemente que el IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, activa a la proteína quinasa AKT en una ruta fundamental para la supervivencia y el control del ciclo celular durante la neurogénesis ótica.

El IGF-1 mantiene los neuroblastos en un estado proliferativo que se caracteriza por la expresión de los factores de transcripción Sox2, Islet1 y *forkhead box* FoxM1. Los neuroblastos óticos expresan receptores de alta afinidad para IGF-1, cuya expresión disminuye en forma paralela al grado de diferenciación celular. Así, las neuronas post-mitóticas comienzan a expresar receptores TrkC para neurotrofinas, proteínas esenciales para la neuritogénesis e inhibidores de ciclo celular como p27Kip.

Nuestros datos indican que durante el desarrollo temprano del oído interno los neuroblastos óticos precisan para su expansión y supervivencia de la activación mediante IGF-1 de la vía PI3K-AKT. Estos datos sugieren un papel esencial de PI3K-AKT en la determinación del número final de neuronas y en el control de la duración de la neurogénesis ótica.

Nota: MRA ha disfrutado de un contrato predoctoral del CSIC. Este trabajo se ha financiado gracias al programa SAF2008 del MICINN.

R03-3

Cell competition In the early mouse embryo

Cristina Villa del Campo, Cristina Clavería Izquierdo, Giovanna Giovino, Rocío Sierra Muñoz y Miguel Torres Sánchez
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid

Cell competition is a tissue homeostasis mechanism described in *Drosophila* that promotes the expansion of the fittest cells through the apoptotic elimination of suboptimal but otherwise viable cells. Recent evidence suggests that cell competition is a general strategy used in metazoan development, tissue homeostasis and regeneration. Myc is an important promoter of cell competition ability, through its action on the cell anabolic machinery. Using a new inducible genetic mosaic approach we have manipulated Myc levels and apoptosis patterns in the mouse embryo. We found that induced differences in the relative Myc levels among neighboring cells triggers cell competition, resulting in the apoptotic death of cells with lower Myc levels. Furthermore, endogenous Myc expression is highly heterogeneous among epiblast cells and those with low relative Myc levels preferentially undergo natural cell death. Inhibition of cell death in the epiblast results in the progressive accumulation of cells with Myc levels lower than those of the general epiblast cell population. Our results suggest that cell competition operates in the early mouse embryo to optimize Myc levels in the epiblast cell population through the elimination of cells with lower Myc expression levels.

R03-4

Arid3b is required for heart development

Veronica Uribe, Claudio Badia-Careaga, Jesus C Casanova y Juan Jose Sanz Ezquerro
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid

Arid3b is a transcription factor from the highly conserved ARID family, whose members share a common DNA-binding domain. Arid3b null-mice die during early stages of embryonic development (E10.5) presenting severe defects in craniofacial structures and cardiovascular system. However, its roles in development are not completely understood. Here, we address the function of Arid3b in the developing heart. We have analysed the pattern of expression of this gene during mouse embryo development and found that it is expressed in the heart from early stages. Using Arid3b knock-out mice, we have performed a detailed anatomical and histological characterization of the cardiac defects in Arid3b mutant embryos. The mutants display different cardiac abnormalities, including alterations in heart morphogenesis and differentiation. The most severe defects are observed in the poles of the heart, especially a noticeable shortening of the outflow tract, reduction of the size of the inflow region and abnormal differentiation of the Atrio-Ventricular canal. Also, expression of several molecular markers of both secondary heart field and heart chambers were altered in mutant embryos, pointing to an important role of Arid3b in different aspects of heart development. Based on in vivo embryonic phenotypes and in vitro cell culture data our hypothesis is that Arid3b could be controlling the regulated addition, motility and differentiation of heart precursor cells from the second heart field to the heart.

R03-5

Elementos reguladores de la expresión de los genes del complejo Iroquois en el gen adyacente *Sosondowah* mantienen ligados a estos genes a lo largo de la evolución

Esther González-Pérez¹, Ignacio Maeso², Manuel Irimia², Juan Tena³, Cristina Piñeiro³, Fernando Casares³, José-Luis Gómez-Skarmeta³, Jordi García-Fernández² y Sonsoles Campuzano¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, ²Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, ³Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC-UPO), Sevilla

Con frecuencia, genes que codifican para proteínas similares y que participan en los mismos procesos se encuentran agrupados formando complejos génicos. Este es el caso de los genes de complejo Iroquois (*C-Iro*) de *Drosophila* que se agrupan en una región genómica de aproximadamente 150 kb. La estructura en forma de complejos ha evolucionado independientemente en otros grupos animales, encontrándose por ejemplo los genes *Iroquois* de vertebrados (denominados genes *Irx*) agrupados en dos complejos génicos. Los diferentes genes *Iro* presentan patrones de expresión muy variados a lo largo del desarrollo, controlados por enhancers específicos de posición que con frecuencia actúan simultáneamente sobre dos o más de los genes del complejo. Estos elementos reguladores se localizan en las amplias regiones intergénicas de los *C-Iro*. Se ha propuesto que el mantenimiento de la estructura en complejos génicos a lo largo de la evolución se debería a la presencia de los elementos reguladores compartidos, que dejarían de funcionar correctamente en caso de desensamblaje de los complejos. En casi todos los organismos bilaterales estudiados, el gen *Sosondowah* (*Sowah*) está ligado a los genes Iroquois, lo que sugería la existencia de una relación funcional entre ambos. En este trabajo demostramos en *Drosophila* que *sowah*, que no está funcionalmente relacionado con los genes del *C-Iro*, alberga elementos enhancer de la expresión de dichos genes en los discos imaginales de ala y de pata y en el embrión. Por tanto, sugerimos que el estrecho ligamiento de *sowah* con los genes del *C-Iro* a lo largo de la evolución se debe a la existencia de elementos reguladores de la expresión de los genes del *C-Iro* dentro de *sowah* y/o en espacio intergénico entre dicho gen y el *C-Iro*.

R03r-6

Identificación de nuevos componentes del diafragma de filtración de *Drosophila melanogaster* por silenciamiento génico

Irene Bodega Mayor, Antonio Sobrado de Vicente-Tutor y Mar Ruiz-Gómez
 Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Los podocitos son células especializadas del glomérulo renal de vertebrados que rodean por completo a los capilares sanguíneos mediante la extensión de prolongaciones llamadas pedicelos. Estos se encuentran conectados entre sí por un tipo de unión celular altamente especializado llamado diafragma de filtración, que junto con el endotelio de los capilares y la membrana basal

glomerular constituyen la barrera de filtración glomerular que regula el paso de moléculas durante el filtrado de la sangre a la orina. En *Drosophila melanogaster* las células que realizan la función filtradora son los nefrocitos, que se encuentran suspendidos en la hemolinfa regulando su composición y retirando sustancias de desecho. Resultados recientes del laboratorio han demostrado que los nefrocitos poseen diafragmas de filtración que son ultraestructural, molecular y funcionalmente homólogos a los de vertebrados [1]. Así pues, los principales constituyentes del diafragma en vertebrados (nefrina, NEPH-1, CD2AP, ZO-1 y podocina) tienen sus ortólogos en el nefrocito (Sitcks and stones, Dumbfounded (Duf), Cindr/Dap160, Polychaetoid (Pyd) y Mec-2). Hemos realizado una búsqueda de nuevos componentes moleculares que puedan contribuir a la formación y/o mantenimiento de esta estructura. Para ello, hemos seleccionado una batería de genes candidatos en función de su expresión en nefrocitos y hemos analizado su requerimiento mediante la aplicación de técnicas de silenciamiento. Los fenotipos generados se han analizado por cambios en la localización de dos componentes del diafragma: Duf y Pyd.

[1] Weavers H, Prieto-Sánchez S, Grawe F, Garcia-López A, Artero R, Wilsch-Bräuninger M, Ruiz-Gómez M, Skaer H, Denholm B. *Nature*, 209; 457 (7227): 322-6.

R04. Biología Molecular Teórica

R04-1

Sampling conformational space of biomolecules in the exascale era

Adrian E. Roitberg

Department of Chemistry and Quantum Theory Project, University of Florida, Gainesville, Florida (USA)

The conformational space in biomolecular systems is vast, and the important configurations must be sampled properly if one is to obtain meaningful data. This is a Herculean task that requires not only computational power but also new ideas in terms of algorithms and data analysis. In this talk I will present some very personal ideas of what type of methods are probably going to be of use as we go to exascale-level computers, with an emphasis on algorithms and will highlight the challenges associated with extreme data generation, data transfer, analysis and storage. I will also present some of our own results inside the Amber suite

of programs, including extensions of the Replica-type algorithms for conformational sampling and free energy calculations.

R04-2

Protein engineering and evolution

Jose Manuel Sánchez Ruiz

Departamento de Química-Física, Universidad de Granada, Granada

We have recently reconstructed and resurrected seven Precambrian thioredoxin enzymes dating back between 1.4 and 4 billion years. These enzymes show denaturation temperatures up to 32 degrees higher than the values for the corresponding modern enzymes and the oldest show higher activity than extant ones at acidic pH. This suggests that thioredoxin enzymes have adapted over 4 billion years to changes in temperature and ocean acidity. The relation stability-structure-function for these ancestral enzymes will be discussed.

R04-3

A network medicine approach to human disease

Patrick Aloy

Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, Barcelona

High-throughput interaction discovery initiatives are providing thousands of novel protein interactions which are unveiling many unexpected links between apparently unrelated biological processes. In particular, analyses of the first draft human interactomes highlight a strong association between protein network connectivity and disease. Indeed, recent exciting studies have exploited the information contained within protein networks to disclose some of the molecular mechanisms underlying complex pathological processes. These findings suggest that both protein-protein interactions and the networks themselves could emerge as a new class of targetable entities, boosting the quest for novel therapeutic strategies. In this talk, I will summarize our work towards the characterization and modelling of the protein-interaction network underlying Alzheimer's disease, together with our most recent attempts to decipher complex cell networks to the point of being able to predict how the perturbation of a node might affect the system as a whole.

R04-4

Discovery of functional protein linear motifs using a greedy algorithm and information theory

Leandro Radusky¹, Juliana Glavina¹, María Fátima Ladelfa², Martín Monte² y Ignacio Enrique Sánchez¹

¹Protein Physiology Laboratory, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina), ²Laboratory for Cell and Molecular Biology, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina)

The molecular basis of many protein-protein interactions is unknown, especially for those reported in high-throughput studies. Many globular domains bind specifically to short (5-15 residues) sequences within intrinsically disordered regions, the so-called "linear motifs". Yet unknown linear motifs may mediate many protein-protein complexes of biological interest.

We present an algorithm that extracts linear motifs from protein-protein interaction datasets, using as input the sequence of all the targets bound by the protein under study. The hypothesis is that any linear motif mediating the interaction will be overrepresented in the disordered regions of these proteins. The presence of homologous proteins would lead to spurious motif overrepresentation and is removed using CD-HIT. Then, disordered regions are identified using VSL.

The user determines the length of the putative motif. Our software first calculates all possible alignments of three words of the specified length in the dataset. We score the motif contained in each alignment using information theory. Next, we offer all possible words to each growing alignment and incorporate the one resulting in the highest information content. We repeat this procedure until incorporation of new words does not increase the information content of any alignment. We then use sequence logos to picture the highest scoring motifs.

Our heuristic greedy algorithm obtains the same results as an exhaustive search in datasets where the latter is feasible. Further, our algorithm is able to rediscover most known functional linear motifs. As a case study, we extract a putative nucleolar localization signal from a database of nucleolar proteins. Localization experiments with proteins from the MAGE family support the putative motif.

R04-5

Valoración de una PCR-RT multiplex en tiempo real para diagnóstico de infección respiratoria viral

Mireia Abal Argente, Francisco Fuentes Blanco, Mari Carmen Martín Pérez, Magali Laboreo Antorán y Maria Gema Codina Grau
Vall d'Hebron-Institut de Recerca, Barcelona

Introducción: La infección respiratoria vírica tiene alta morbilidad y mortalidad, especialmente en inmunodeprimidos. Para su diagnóstico precoz es esencial una técnica sensible, sencilla y rápida.

Objetivos: Valorar la utilidad de una por RT-PCR múltiple en tiempo real con extracción de ácidos nucleicos automatizada.

Pacientes y muestras: 51 muestras de vías respiratorias altas de 45 pacientes.

Métodos: IFD (*Ultra 8 DFA, Diagnostic Hybrids*), que detecta influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3, adenovirus, virus respiratorio sincitial (VRS) y metapneumovirus. RT-PCR múltiple (*FilmArray, Idaho technologies*) que detecta además, subtipos de influenza A, parainfluenza 4, coronavirus NL63, OC43, 229E y HKU1, bocavirus, rinovirus, *B. pertussis*, *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*.

Resultados: En 43 muestras con IFD negativa la PCR fue negativa en 19, y detectó rinovirus en 14, coronavirus en 3, rinovirus y coronavirus en 1 y *B. pertussis* en 1. Además, en 5 casos detectó virus incluidos en la IFD (parainfluenza 3 en 2 casos, parainfluenza 3 y *B. pertussis* en 1, parainfluenza 3 y rinovirus en 1; y VRS, rinovirus y coronavirus en 1). Estos 5 pacientes tenían muestras anteriores en los que se había diagnosticado el mismo virus por IFD.

En 8 muestras con IFD positiva (parainfluenza 3 en 4 casos, parainfluenza 3 y adenovirus en 1, gripe B en 1, adenovirus en 1 y metapneumovirus en 1), la PCR coincidió en todos los casos excepto en 2 en los que, además de detectar parainfluenza 3, también encontró rinovirus.

Conclusiones: Filmarray permite hacer el diagnóstico en 1 hora y con un trabajo técnico mínimo. Es más sensible que la IFD porque detecta más agentes, especialmente rinovirus y coronavirus, aunque puede dar resultados positivos en casos de infección pasada.

R05. Biomembranas y Bioenergética

R05-1

Regulación de los neurotransportadores de glicina GLYT1 y GLYT2 por receptores purinérgicos P2Y

E. Jiménez¹, F. Zafra¹, R. Pérez-Sen², E.G. Delicado², M.T. Miras-Portugal², C. Aragón¹ y B. López-Corcuera¹

¹CBMSO (CSIC-UAM), CIBERER, Madrid, ²Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid

Los transportadores de glicina dependientes de Na⁺ y Cl⁻ controlan la disponibilidad del neurotransmisor en las sinapsis mediadas por glicina. GLYT1 (glial) es el principal regulador de las concentraciones de glicina en vías glicinérgicas y glutamatérgicas. GLYT2 (neuronal) recicla la glicina en sinapsis inhibitorias. Este estudio demuestra que la estimulación de receptores purinérgicos P2Y con 2-metilto-adenosina-5'-difosfato (2MeSADP) en cultivos primarios de neuronas del tallo cerebral/médula espinal de rata y sinaptosomas de rata adulta inhibe a GLYT2 y activa a GLYT1 mediante regulación paracrina. Esta acción es mediada por los subtipos P2Y1 y P2Y13, pues los efectos se aminoran por antagonistas específicos N6-metil-2'-3'-desoxiadenosina, 5'-bisfosfato (MRS2179) y piridoxal-5'-fosfato azo-6-(2-cloro-5-nitrofenil) -2,4-disulfonato (MRS2211), y se bloquean totalmente por suramina. Hemos investigado los mecanismos moleculares de esta regulación mediante bloqueo farmacológico y por siRNA de distintos pasos de las posibles vías implicadas. La modulación se lleva a cabo a través de una cascada de señalización que involucra la activación de fosfolipasa C, la producción de inositol-1,4,5-trifosfato, la movilización de Ca²⁺ intracelular, la estimulación de PKC, la formación de óxido nítrico (NO), la producción de GMPc y la activación de PKG-I. GLYT1 y GLYT2 son diferencialmente sensibles a la ruta NO/GMPc/PKG-I tanto en preparaciones de tejido nervioso como en sistemas heterólogos que expresan transportadores y receptores P2Y1 recombinantes. La sensibilidad a 2MeSADP de GLYT1 y GLYT2 se abole mediante siRNA específico de la NOS. Nuestros datos pueden ayudar a definir el papel de los GLYT en nocicepción y en sensibilización al dolor.

R05-2

Transferencia electrónica al fotosistema I: in vivo versus in vitro

Manuel Hervás y José A. Navarro
*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis,
 Universidad de Sevilla y CSIC, cicCartuja, Sevilla*

La interacción in vitro de la plastocianina (Pc) y el citocromo c_6 (Cit), donadores alternativos de electrones al fotosistema I (PSI), con dicho complejo de membrana está bien establecida en muy diferentes tipos de organismos fotosintéticos. Sin embargo, se ha postulado que la interacción entre biomoléculas in vivo puede estar muy influenciada por lo que se conoce como *crowding* molecular. El *crowding* molecular presenta dos efectos contrapuestos: por una parte, la disminución del volumen disponible lleva a un incremento de concentración de los reaccionantes, favoreciendo la interacción; por otra, el incremento de la viscosidad dificulta el encuentro entre los reaccionantes. El balance neto depende de cada sistema. Hemos analizado, mediante espectroscopia de excitación por láser, el efecto de diferentes agentes que emulan el *crowding* molecular, en la cinética de la reacción entre Pc o Cit y el PSI en tres cianobacterias diferentes y un alga verde con donadores de electrones de distinto carácter electrostático, para determinar cómo afecta el *crowding* molecular a dicha interacción. El efecto negativo de la viscosidad, estudiado utilizando concentraciones crecientes de sacarosa, en la interacción de los dos donadores con el PSI es muy similar para los tres sistemas de cianobacterias. La albúmina parece alterar los diferentes sistemas de una manera específica, probablemente por medio de interacciones electrostáticas con las proteínas donadoras. Ficoll y dextrano se comportan de una manera paralela, favoreciendo la interacción con un factor medio de 2. En cuanto al sistema eucariota, un fuerte efecto negativo de la viscosidad es capaz de superar el efecto favorable de cualquier agente de *crowding*, tal vez debido a una interacción electrostática donador/PSI más fuerte.

R05r-3

Células madre mesenquimales derivadas de placenta como modelo para el estudio de la biogénesis y tráfico celular del surfactante pulmonar

Alejandro Cerrada¹, Thomas Haller², Ana Isabel Flores³ y Jesús Pérez-Gil¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Departamento de

*Fisiología y Física Médica. Facultad de Medicina.
 Universidad de Innsbruck, Innsbruck (Austria),
³Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre,
 Madrid*

El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico esencial para la vida, que reduce la tensión superficial en la interfase aire-líquido de los alvéolos para evitar el colapso del pulmón al final de la espiración.

El surfactante es sintetizado y secretado por los neumocitos tipo 2 (NT2), residentes en el epitelio alveolar. En la actualidad no existen líneas celulares modelo de neumocitos capaces de sintetizar surfactante de novo, algo necesario para profundizar en la caracterización de los procesos implicados en la biogénesis de surfactante.

Recientemente, se ha llevado a cabo la diferenciación de células madre mesenquimales de placenta humana hacia células con fenotipos propios de NT2 (PLCs, pneumocyte-like cells). En el presente estudio, se han caracterizado estas células diferenciadas desde un punto de vista morfológico, ultraestructural, bioquímico y funcional. Las PLCs expresan marcadores de desarrollo pulmonar, sintetizan proteínas características del surfactante, y contienen en su citoplasma unos orgánulos similares a los cuerpos lamelares (LBs, lamellar bodies), las vesículas encargadas del almacenaje de surfactante en los NT2. La estimulación con secretagogos de estas células induce la liberación al medio de un contenido de carácter membranoso, en una respuesta similar a la que exhiben los NT2, revelando un activo metabolismo lipídico así como capacidad de respuesta ante la estimulación de la secreción. Las PLCs pueden proporcionar así un exclusivo modelo ex vivo para el estudio de la biogénesis del surfactante, incluyendo la caracterización tanto del procesamiento de las proteínas y el tráfico lipídico, como del empaquetamiento y almacenaje de los complejos lipoproteicos de surfactante dentro de los LBs y su secreción al medio extracelular.

R05-4

Influencia del diacilglicerol y los ésteres de forbol en la unión de los dominios C1B de proteínas quinasas C a membranas modelo

Antonio Luis Egea-Jiménez, Sonia Sánchez-Bautista, Senena Corbalán-García y Juan Carmelo Gómez-Fernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Murcia

Los dominios C1 son miembros de la superfamilia de dominios ricos en Cys, se componen de 50-51 aminoácidos y están presentes en diferentes familias de proteínas como

en las isoformas de la Proteína Quinasa C (PKC).

Una característica común de las PKCclásicas (PKCc) y PKCnuevas (PKCn) es que poseen dos dominios C1 colocados en tándem, designados como dominios C1A y C1B. Estos dominios actúan como módulos de reconocimiento para el segundo mensajero, el diacilglicerol (DAG), y para agentes exógenos como los ésteres de forbol, ejerciendo una función muy importante en el anclaje de la proteína a la membrana.

El objetivo de este trabajo es caracterizar la afinidad de unión que presentan los dominios C1B de las isoformas PKC γ , PKC ϵ , PKC δ y PKC θ para distintos fosfolípidos aniónicos: 1-palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfato (POPA); 1-palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS); 1-palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG); y a diferentes concentraciones de 1,2-sn-dioleilglicerol (DOG) y forbol 12-miristato-13-acetato (PMA).

Para su realización expresamos los diferentes dominios C1Bs fusionados a la Proteína Fluorescente Verdeazulada (CFP) en células de mamífero HEK293. Los lisados celulares se utilizaron en la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) donde la CFP actuó como fluoróforo donante, y como fluoróforo aceptor la sonda Oregon Green incorporada a las vesículas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que cuando las vesículas contienen DOG, la afinidad en la unión de la proteína a la membrana aumenta al incrementar la concentración de fosfolípido negativo. Esta afinidad depende del lípido utilizado en el ensayo, siendo máxima para el POPA en el caso de los dominios C1B γ , C1B ϵ y C1B θ ; y con el POPS para el dominio C1B δ , aunque cuando los 4 dominios son comparados, las afinidades de unión son siempre mayores para el C1B ϵ ante cualquier combinación de fosfolípido negativo. Al sustituir el DOG por el PMA, las diferencias encontradas entre fosfolípidos negativos disminuyen, incrementándose la K_A ~3 veces para todos ellos.

³CNRS, URA 2096 (Systèmes membranaires, photobiologie, stress et détoxication) y CEA, iBiTecS (Institut de Biologie et Technologies de Saclay), Gif-sur-Yvette (France)

La peroxidación lipídica celular es consecuencia del ataque de ROS a los fosfolípidos de membrana, siendo HNE uno de los compuestos más tóxicos resultante de la misma. HNE se ha relacionado con la etiología de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y diabetes. Su reactividad radica en su estructura química, que lo convierte en un potente electrófilo capaz de interactuar con los grupos nucleofílicos presentes en las macromoléculas. Muchos estudios lo han implicado en la pérdida de funcionalidad de diferentes proteínas celulares, con las que reacciona a través de Lys, Cys e His. Debido a la importancia del Ca²⁺ en señalización celular y a que en el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺ celular entran en juego numerosas proteínas, se decidió estudiar "in vitro" el efecto de HNE sobre el transporte neto de este ion en vesículas de RS. Los resultados muestran que el tratamiento con HNE afecta a la funcionalidad de la SERCA1a, alterando la hidrólisis y unión de ATP, el transporte de Ca²⁺ y la formación del intermediario fosforilado. Así mismo, el tratamiento con concentraciones de HNE más bajas que las que afectan a la actividad ATPasa ocasiona un aumento en la permeabilidad pasiva a Ca²⁺, lo cual no se debe a alteraciones en la bicapa lipídica. Analizando por western-blot las proteínas marcadas con HNE, se vio que además de SERCA1a, otras dos proteínas que migran a la altura de 150-170kDa presentan aductos con HNE, éstas podrían ser sarcolumenina e Histidin Rich Calcium Binding Protein (HRC), ambas reguladoras de los canales RyR. Esto parece indicar que la interacción de HNE con estas proteínas promueve vías de salida de Ca²⁺ del RS que estarían implicadas en los efectos tóxicos de HNE.

Nota: Financiado por Junta de Extremadura-FEDER (GRU10046) y CNRS y CEA.

R05r-5

Desregulación del transporte neto de CA²⁺ por acción de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) en vesículas de retículo sarcoplásmico (RS) de músculo esquelético de conejo

María Pura Hortigón-Vinagre¹, Solenne Chardonnet², Cédric Montigny³, Yolanda Gutiérrez-Martín¹, Philippe Champeil³ y Fernando Henao¹

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura, Badajoz, España, ²Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Université Paris-Sud, y CNRS, UMR 8619, Orsay (France),

R05-6

Estudio 2DCOS del efecto del pH en la transición de fase lipídica en procesos amiloidogénicos

Ana M^a Salvador Ibáñez¹, M^a Angeles Frias², Jon Ander Nieto Garai³, Anibal Disalvo² y José Luis Rodríguez Arrondo⁴

¹Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV/EHU), Leioa, ²Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (Argentina), ³Departamento de

Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, ⁴Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV-EHU); Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC -UPV-EHU), Leioa

El proceso de amiloidogénesis implica una perturbación en la proteína que le conduce a un proceso de agregación en vez de a una estructura tridimensional activa. Se ha postulado que prácticamente todas las proteínas son capaces de formar fibras, siempre que se consiga la desestabilización previa, independientemente de que esta formación de fibras se produzca en condiciones fisiológicas. El caso más común es el de la insulina, una pequeña proteína con enlaces disulfuro que se mantienen al formarse la fibra a pH 2.0 y temperatura de 70°C. En estas condiciones en unos 30 minutos se produce la formación del protómero que posteriormente dará lugar a la fibra madura. Los estudios del efecto de los lípidos sobre el proceso de amiloidogénesis inducido en insulina no han analizado con detenimiento las variaciones que se producen en los lípidos con el cambio de pH. En el presente trabajo, se realiza un estudio por 2DCOS de la transición de fase de la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a pDs 2.0 y 7.0. La transición de fase del lípido a pD2 y a pD7 en presencia y ausencia de insulina fue seguida a través de la determinación de las vibraciones simétricas y asimétricas de los metilenos de las cadenas hidrocarbonadas y por la relación entre las poblaciones hidratadas y deshidratadas de los grupos carbonilo en función de la temperatura. Dado que la amiloidosis se produce en presencia de interfases lipídicas, estos estudios pueden tener relevancia fisiológica, ya que es sabido que existen microdominios lipídicos en donde las propiedades del agua pueden generar pH locales muy diferentes a los del agua en una solución.

R05-7

Formación selectiva de canales oligoméricos Kv7.5 (KCNQ5)/KCNE1 y Kv7.5 (KCNQ5)/KCNE3. Localización diferencial en microdominios de membrana

Laura Solé¹, Meritxell Roura-Ferrer², Anna Oliveras¹, Albert Vallejo¹, Sara Roig¹, Núria Comes¹, Alvaro Villarroya² y Antonio Felipe¹

¹Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Unidad de Biofísica, CSIC-UPV/EHU, Universidad del País Vasco, Leioa

Las canales de potasio Kv7 (KCNQ) conforman una familia de canales de potasio dependientes de voltaje compuesta de 5 miembros (Kv7.1–Kv7.5). Kv7.1 es fundamental en la

función cardíaca y Kv7.2–Kv7.5 contribuyen a la corriente M del sistema nervioso. Kv7.5 también se expresa en musculatura donde actualmente se está evaluando su papel fisiológico. Las asociaciones de Kv7 con subunidades accesorias KCNE (KCNE1–5) incrementan su diversidad. Los KCNE controlan la expresión en superficie, la dependencia de voltaje, la cinética y la farmacología de varios canales. En este trabajo describimos que Kv7.5 y las subunidades KCNE se co-expresan en musculatura esquelética pudiéndose asociar oligoméricamente e influir sobre la diversidad funcional de Kv7.5. La expresión heteróloga demuestra que KCNE1 y KCNE3, pero no las demás isoformas KCNE, interaccionan con Kv7.5. KCNE1 ralentiza la activación y suprime la rectificación anómala y KCNE3 inhibe la corriente de Kv7.5. KCNE1 incrementa la corriente de Kv7.5 en células HEK. La localización en la membrana de los canales también se ve afectada. El aislamiento bioquímico de las balsas lipídicas, denominadas *lipid rafts*, demuestra que mientras que Kv7.5 no se localiza de forma eficiente en estos compartimentos, KCNE1 y KCNE3 se distribuyen de forma diferencial. KCNE3 colocaliza en rafts, pero KCNE1 no. La asociación de Kv7.5 con KCNE3 modifica negativamente la presencia de KCNE3 en las balsas. Este último resultado es ratificado por la dinámica de membrana del complejo, analizada mediante un análisis de tipo FRAP. Nuestros resultados tienen relevancia fisiológica ya que Kv7.5 se expresa de forma abundante en musculatura, tanto lisa como esquelética, y su asociación con los péptidos KCNE puede modular las respuestas fisiológicas.

R06. Bioquímica de la Nutrición

R06-1

El síndrome metabólico

Marià Alemany Lamana

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona

El grupo de enfermedades que conocemos como síndrome metabólico (SM) es, de hecho, una sola, la enfermedad de abundancia. Se desarrolla por nuestra falta de adaptación evolutiva a los retos que plantea el estilo de vida actual: no estamos preparados para el exceso de nutrientes, en especial lípidos, en la dieta. Tenemos mecanismos de ahorro energético pero carecemos de sistemas que nos permitan eliminar eficazmente la energía sobrante. El exceso de lípidos nos impide utilizar la glucosa, que a su vez limita la oxidación de aminoácidos. El tejido adiposo recibe la

mayor parte de la esta sobrecarga, pero no puede gestionarla. Los adipocitos crecen y emiten señales de alarma que inducen la llegada macrófagos para luchar contra un enemigo invisible para el que no estan preparados. La respuesta agrava la situación, desajustando los sistemas metabólicos de regulación y de flujo de sangre a los tejidos, produciendo hipoxia, estrés del REP, ROS, daños mitocondriales, sobreproducción de NO₂, desajustes en el ponderostato y en el reparto energético. Como consecuencia aparecen los componentes del SM: resistencia a la insulina (y diabetes t2), obesidad, hipertensión, hiperlipidemias, aterosclerosis, esteatosis hepática, depresión, apnea del sueño, fibrilación auricular, hiperuricemia, etc. Un largo catálogo que aumenta en paralelo a nuestro conocimiento. A pesar de que conocemos buena parte de los mecanismos patogénicos (rápidos) a nivel molecular, el SM a menudo requiere años para manifestarse en su plenitud. Esta demora puede deberse a cambios en andrógenos y estrógenos a lo largo de nuestro ciclo vital, en oposición al papel dominante de los glucocorticoides (liberados como respuesta a la reacción inmune).

reflejando los cambios que suceden en otros órganos internos como el hígado y el tejido adiposo. De entre los genes afectados, la mayoría están implicados en el metabolismo lipídico. En ratas obesas, el número de genes regulados por ayuno/realimentación es mucho menor, evidenciando una insensibilidad a las condiciones de alimentación que se manifiesta a medida que los animales van desarrollando sobrepeso. La expresión de genes clave del metabolismo lipídico también se ve afectada en PBMC de ratas en respuesta a la alimentación con dietas isocalóricas con diferente composición nutricional (estándar/hiperlipídica), siendo la respuesta similar a la observada en hígado. La obesidad es otro factor que produce un profundo cambio en el patrón de expresión de las PBMC. Las PBMC pueden, pues, reflejar con fidelidad cambios metabólicos relacionados con cambios en las condiciones de alimentación y en la composición nutricional de la dieta y con el estado de obesidad. Por tanto, estas células son una fuente potencial de biomarcadores tempranos de desequilibrio homeostático útiles en estudios de nutrición y que pueden ayudar a predecir/prevenir la aparición de sobrepeso/obesidad.

R06-2

Utilidad de las células sanguíneas (PBMC) como fuente de biomarcadores en estudios de nutrición y obesidad

Paula Oliver¹, Antoni Caimari², Rubén Díaz-Rúa¹, Bàrbara Reynolds¹ y Andreu Palou¹

¹Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología. Universidad de las Islas Baleares (UIB) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca,

²Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología. Universidad de las Islas Baleares (UIB) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca, y Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), Reus

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) constituyen un material biológico de fácil recolección, cuyo uso en investigación está aumentando. El hecho de que presenten receptores de insulina y leptina y expresen moléculas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis energética, nos hizo plantearnos su utilidad en estudios de nutrición y obesidad. Nuestros estudios con ratas revelan que en las PBMC la expresión de genes clave del metabolismo energético (estudiada con técnicas -ómicas) varía en respuesta a cambios agudos en las condiciones de alimentación (ayuno/realimentación)

R06-3

Resveratrol: ¿una molécula antiobesidad?

María del Puy Portillo

Grupo Nutrición y Obesidad. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco, Vitoria

En la línea de búsqueda de nuevas moléculas que resulten eficaces para evitar el exceso de acumulación de grasa corporal y sus complicaciones asociadas cabe destacar el resveratrol (3,4',5-trihidroxistilbeno). Se trata de un polifenol presente en diferentes alimentos y bebidas de origen vegetal, tales como las uvas (hollejo y pepita) y las bebidas derivadas de ellas (vino, mosto), frutas tipo baya y algunos frutos secos. Esta molécula ha sido estudiada desde hace muchos años por sus efectos antioxidante, antiagregante plaquetario, vasodilatador, hipolipemiante, anticarcinogénico y anticancerígeno. Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha despertado el interés por este polifenol como molécula capaz de modificar el metabolismo lipídico y por tanto con potencial como ingrediente funcional de interés en la prevención de la obesidad. Los estudios realizados hasta la fecha ponen de manifiesto que el resveratrol es capaz de reducir la acumulación de triglicéridos en adipocitos en cultivo, así como la grasa corporal, y en ocasiones incluso el peso corporal, en roedores. Se han descubierto algunos de los mecanismos de acción que pueden justificar estos efectos.

Se sabe que el resveratrol inhibe la proliferación y diferenciación de los preadipocitos, induce apoptosis de los adipocitos maduros, aumenta la movilización lipídica, disminuye la lipogénesis y aumenta de la mitocondriogénesis. Por tanto, aunque todavía no se han publicado estudios realizados en humanos, los resultados obtenidos con células y con modelos animales inducen a pensar que existen buenas perspectivas en relación con esta molécula.

R06m-4

El páncreas como diana de los efectos de las procianidinas de la uva

Montserrat Pinent, Anna Ardévol, Lluís Arola, Cinta Bladé, M. Teresa Blay, Anna Arola, Anna Castell-Auví, Lúdia Cedó, Juan Fernández-Larrea, Santiago García-Vallvé, Miquel Mulero, Gerard Pujadas y M. Josepa Salvadó

*Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili, Tarragona*

Las procianidinas de pepita de uva (GSPE) son compuestos fenólicos con efectos beneficiosos para la salud. Entre estos efectos, hemos observado que el GSPE modula la homeostasis de la glucosa, en parte actuando sobre la resistencia periférica a la insulina. Dada la relevancia del páncreas en la homeostasis glucídica, nos hemos interesado en los efectos del GSPE en este órgano. Experimentos in vivo muestran que el GSPE actúa sobre el páncreas. En ratas con obesidad inducida por la dieta, el GSPE reduce la acumulación de triglicéridos en el páncreas, así como disminuye la expresión génica y cantidad de insulina en este órgano. Estos cambios van acompañados por un aumento de los marcadores de apoptosis. In vitro se observa que en condiciones de glucotoxicidad, las procianidinas potencian la apoptosis en células beta, y además contrarrestan los efectos proliferativos de la glucosa y la insulina. Estos efectos pueden ser en parte responsables de la disminución de insulina plasmática en condiciones en las que GSPE ocasiona una mejora paralela de la resistencia a insulina. Por otro lado, observamos que en ratas sanas el GSPE no modifica la apoptosis ni la masa de células beta, así como tampoco se observan efectos de GSPE sobre proliferación y apoptosis en experimentos in vitro en células beta INS-1 y en islotes pancreáticos en condiciones basales. Sin embargo, en dichas ratas sanas el GSPE sí tiene efectos sobre la funcionalidad de los islotes pancreáticos y modula la expresión génica, aunque dichos cambios no modifican los parámetros plasmáticos. En conjunto, los resultados muestran que el páncreas es una diana del GSPE, y que se afecta diferencialmente según la situación del metabolismo glucídico.

R06-5

Obesidad e inflamación, ¿corre el tiempo a nuestro favor?

Martín Alcalá Díaz-Mor¹, Isabel Sánchez-Vera Gómez-Trelles², Victoria Eugenia Bolado García¹ y Marta Viana Arribas¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Madrid

El estado inflamatorio crónico asociado a la obesidad juega un papel central en el desarrollo de resistencia a la insulina.

Objetivos: Estudiar el efecto de la exposición a factores proinflamatorios y prodiabéticos a largo plazo, en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratón.

Métodos: 44 ratones macho C57BL/6J se dividieron en 2 grupos: no obesos (C; dieta con 10% de contenido en grasa) y ratones alimentados con dieta grasa (O; dieta con 45% de contenido en grasa). Determinamos factores inflamatorios en plasma tras 28 y 40 semanas de dieta.

Resultados: Se observó una elevada resistencia a la insulina (RI) en el grupo O en la semana 28 (HOMA: 73.89±11.20 vs 9.29±0.88, p<0.001). En semana 40 se produjo una disminución en el HOMA de O comparado con la semana 28 (42.39±10.16, p<0.05), aunque todavía significativamente mayor que su respectivo control (13.37±1.62, p<0.05). Todos los parámetros inflamatorios plasmáticos estudiados (resistina, leptina, IL-6 y TNF- α) están incrementados en O comparado con C, especialmente en semana 28, diferencia que se pierde en la semana 40. Sin embargo, sólo se observa una disminución en los valores de leptina del grupo O desde semana 28 a semana 40 (28O: 37.00±7.98 vs. 40O: 22.19±2.17, p<0.05), que va en paralelo con lo observado en la RI (HOMA).

Conclusiones: En la obesidad a largo plazo inducida por dieta se produce un proceso de adaptación metabólica que podría estar relacionado con una disminución en los valores de leptina plasmática.

R06-6

La suplementación moderada con vitamina A durante la lactancia aumenta la obesidad inducida por la dieta en ratas

Joan Ribot, Nuria Granados, Jaime Amengual, Enzo Ceresi, Andreu Palou y M. Luisa Bonet
Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (Nutrigenómica). Universitat de les Illes Balears (UIB) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma

La vitamina A, como ácido retinoico, se ha relacionado con el control de la adiposidad en animales adultos. Sin embargo, poco se sabe sobre su impacto durante la lactancia sobre el desarrollo del tejido adiposo y la adiposidad en la edad adulta.

Crías de rata fueron tratadas con una dosis oral diaria de retinil palmitato (3 veces su ingesta diaria de vitamina A; VIA) o con vehículo (aceite de oliva; CON) durante la lactancia. Tras el destete, ratas CON y VIA fueron alimentadas durante 16 semanas con una dieta normal o hiperlipídica. Asimismo, ratas CON y VIA fueron sacrificadas el día del destete. Se analizaron parámetros relacionados con el metabolismo energético, la expresión génica, y la morfología del tejido adiposo blanco inguinal (TABi).

A pesar de no mostrar diferencias en el peso o la ingesta calórica, las ratas VIA desarrollaron una mayor adiposidad tras la alimentación con la dieta hiperlipídica, tal como mostró el análisis de la composición corporal, la leptinemia, y el aumento de la masa tisular, el diámetro celular, el contenido total de ADN y la expresión de leptina en el TABi. Las crías VIA presentaron en el TABi un porcentaje mayor de células pequeñas, y cambios en la expresión de genes coherentes con un mayor potencial de proliferación celular del depósito, que se correlacionaron con una menor expresión de marcadores adipogénicos. Se obtuvo evidencia de un aumento de las respuestas transcripcionales mediadas por ácido retinoico en tejidos de crías VIA.

En resumen, un incremento moderado de vitamina A en las primeras etapas de la vida postnatal puede influenciar a largo plazo la adiposidad corporal, a través de efectos sobre el tejido adiposo en esas etapas, posiblemente mediados por el ácido retinoico.

R06r-7

El ácido maslínico estimula las deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato en la dorada (*Sparus aurata*)

Eva. E Rufino-Palomares¹, Juan Peragón Sánchez², Fernando Reyes Zurita¹, Khalida Mokhtari¹, Leticia García Salguero¹ y José Antonio Lupiáñez Cara¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, ²Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Jaén

El ácido maslínico (AM), utilizado como aditivo alimentario, estimula el crecimiento y recambio proteico en algunas especies de peces. En el presente trabajo, se han investigado los efectos del AM sobre el comportamiento

cinético y los niveles de expresión proteica de dos enzimas claves en el ciclo de las pentosas fosfato, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). Doradas de 12 g de peso fueron alimentadas durante 210 días, en condiciones de piscifactoría, con dietas que contenían 0 (control) y 100 mg de AM (AM₁₀₀) por kg dieta mediante alimentación ad libitum (AL) y alimentación restringida al 1,5% del peso corporal (R). Los peces alimentados con AM presentaron un mayor crecimiento corporal al final del ensayo experimental. La actividad específica G6PDH y 6PGDH, V_{max}, eficiencia catalítica y actividad total incrementaron significativamente en el hígado y músculo blanco de doradas alimentadas con AM. La K_m se vio modificada principalmente en los grupos alimentados con dieta AM₁₀₀ y ración restringida. Los resultados de “Western-blot” mostraron un incremento en los niveles de expresión de la G6PDH y 6PGDH en doradas alimentadas con AM, independientemente del régimen de alimentación. Nuestros resultados muestran que, en la dorada, G6PDH y 6PGDH, son dos enzimas inducibles y regulados por AM. El AM, añadido a la dieta, es capaz de estimular el crecimiento de la dorada, tanto a nivel fisiológico, como a nivel molecular.

Nota: Trabajo financiado por la Junta de Andalucía, la OTRI de la Universidad de Granada y las empresas Biomáslinic S.L., Granada y Azucarera del Guadalfeo, División de Acuicultura Marina, Salobreña, Granada.

R06-8

Valoración del estado nutricional de enfermos de Alzheimer

Magdalena Martínez Tomé¹, Fátima Olea Serrano², Miguel Mariscal Arcas², Antonia M. Jiménez Monreal³, Claudia Rosario Gómez³, Luis García Diz⁴ y M. Antonia Murcia Tomás³

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología Universidad de Murcia, Murcia,

²Departamento de Nutrición y Bromatología.

Universidad de Granada, Granada, ³Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología.

Universidad de Murcia, Murcia, ⁴Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Objetivo: Valorar el estado nutricional de pacientes con Alzheimer.

Diseño: Se realizó un estudio descriptivo, observacional y de carácter transversal.

Sujetos de estudio: 7 hombres y 18 mujeres con edad entre 63 y 91 años. Con un diagnóstico de Alzheimer grado GDS-4, pacientes de la UD del Hospital Virgen de la Arrixaca, junto con sus acompañantes.

Métodos: Cuestionario Recuerdo de 24 horas (R24h) durante tres días. Mini Nutricional Assessment (MNA), Nutrition Screening Initiative Check List, (NSI) versión en castellano (CSSN).

Resultados: Energía mayor en los hombres que mujeres, para las proteínas están dentro de la recomendación para ambos sexos. Los pacientes están en el límite superior para el porcentaje de las grasas (AGS por encima, AGM dentro de las IR, AGP por debajo). Los niveles de fibra estuvieron por debajo de las IR, así como las vitaminas B₆, A, D₃, E, cinc, magnesio, (para ambos sexos). La ingesta del calcio y potasio en mujeres está por debajo de la recomendación, mientras que los hombres se acercan a la recomendación, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,006$) en el caso del potasio.

MNA: Los resultados derivados del cuestionario MNA indican que la mayor parte de la población (76%) se encuentra en riesgo de malnutrición, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$).

CSSN: El 48% de nuestros pacientes se encontraron en un nivel "medio" de riesgo nutricional.

Conclusión: El riesgo de malnutrición está presente en los pacientes con Alzheimer. Las estrategias y métodos para la detección del riesgo nutricional son importantes ya que con ello podemos identificar los factores que lo desarrollan y así dar una pronta intervención nutricional.

papel que el desarrollo embrionario podría jugar en la biología del envejecimiento.

R07-2

Lípidos frente a glucosa durante la gestación en el control del peso corporal del recién nacido

Henar Ortega-Senovilla y Emilio Herrera Castillón
Dpto. Biología. Facultades de Farmacia y Medicina. Universidad San Pablo-CEU, Madrid

Entre las complicaciones más frecuentes asociadas a la diabetes gestacional (DG) está la macrosomía por aumento de tejido adiposo: estos neonatos tienen mayor riesgo de sufrir complicaciones perinatales y de desarrollar diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares en su vida adulta. El mecanismo por el que la DG incrementa el tejido adiposo fetal, no se conoce. La mayor resistencia a la insulina que aparece en estas mujeres, se acompaña de hiperglicemia e hipertrigliceridemia, que podrían aumentar la disponibilidad y transferencia de sustratos al feto y con ello contribuir a su mayor desarrollo. Pero cuando mujeres con DG mantienen un buen control glucémico, hemos observado que son los niveles circulantes de triacilglicéridos y ácidos grasos libres, pero no los de glucosa, los sustratos que se correlacionan positivamente con el peso de los neonatos y el tejido adiposo que estos acumulan [1]. A ello probablemente contribuye: *a)* el que los fetos de madres con DG muestren variaciones en el metabolismo de los ácidos grasos, respecto a los de controles [2]; *b)* que en la placenta de estas gestantes, se producen cambios en los transportadores, que pueden aumentar el flujo de lípidos hacia el feto; *c)* que junto con la placenta, el propio tejido adiposo muestra diferencias en la regulación de la producción de citoquinas respecto a una gestación control. Por todo ello, se puede concluir que en la DG, las alteraciones en el metabolismo lipídico más que la hiperglicemia, constituyen un factor de riesgo para la macrosomía.

[1] Herrera E, Ortega-Senovilla H. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24 (4):515-26.

[2] Ortega-Senovilla H, Alvino G, Taricco E, et al. *Diabetes Care* 2009; 32 (1): 120-2.

R07. Bioquímica Perinatal

R07-1

Programación intrauterina del envejecimiento

Óscar Fernández-Capetillo

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid

El daño en el DNA es una fuente conocida de cáncer y envejecimiento. Sin embargo, la importancia de las diferentes fuentes de daño en el DNA (por ejemplo, telómeros erosionados, ROS, etc.) en estos procesos está todavía por definir. Nuestro laboratorio se ha centrado en estudiar el papel de un tipo de daño conocido como estrés replicativo (RS) y que se da cada vez que una célula duplica su DNA. En este contexto, uno de nuestros trabajos reveló que la acumulación intrauterina de RS puede condicionar el envejecimiento futuro. Este trabajo ya data de hace un par de años (Murga *et al. Nat Genet* 2009; Fernández-Capetillo O. *EMBO Rep* 2010). En esta charla, discutiré cómo llegamos a estas conclusiones y cuáles creo que son las implicaciones de nuestras investigaciones para entender el

R07-3

La nutrición perinatal en machos programa la expresión de genes lipogénicos en la segunda generación filial mediante mecanismos epigenéticos

Josep C. Jiménez-Chillarón

Fundació Sant Joan de Déu-Hospital Sant Joan de Déu, Endocrinología, Esplugues de Llobregat

Estudios epidemiológicos demuestran los individuos que presentan retraso del crecimiento intrauterino y bajo peso al nacer tienen un riesgo muy elevado de sufrir obesidad, resistencia a la insulina y diabetes cuando alcanzan la edad adulta. Además, la programación fetal de las enfermedades del adulto puede manifestarse incluso en la siguiente generación filial (efectos transgeneracionales). Se ha propuesto que los mecanismos epigenéticos (metilación del DNA, modificaciones de histonas, RNA no codificantes) pueden ser un buen candidato para explicar la asociación entre retraso del crecimiento intrauterino y el desarrollo de problemas metabólicos en el futuro.

Previamente, hemos desarrollado un modelo murino de retraso del crecimiento intrauterino (IUGR= *Intrauterine Growth Restriction*) y bajo peso al nacer. Al igual que ocurre en la clínica, los ratones IUGR desarrollan obesidad y diabetes cuando son adultos. De manera muy llamativa, los descendientes de los ratones IUGR (IUGR-F2) también desarrollaron algunos aspectos del síndrome metabólico, a pesar de que no se han visto expuestos a ningún tipo de estrés nutricional durante su desarrollo embrionario. En particular, demostramos que la expresión de genes implicados en la regulación de la lipogénesis está alterada en tanto en hígados de ratones IUGR-F1 como IUGR-F2 (Srebf1, Acc2, Fasn, Scd1). Posteriormente, analizamos el patrón de metilación del DNA en hígados de ratones IUGR-F1 y F2. El patrón de metilación de 263 *loci* se encuentra alterado en ambas generaciones. De manera muy llamativa, Srebf1 es uno de los genes con más significación en esta lista. Por consiguiente, proponemos que los cambios de expresión de este gen se pueden explicar, en parte, mediante cambios en el patrón de metilación de la región promotora.

¹CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid,

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid

En los últimos años, la incidencia de diabetes tipo 2 ha adquirido dimensiones epidémicas. Se sabe que la carga genética de un individuo pero también la influencia de determinados factores medioambientales pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad. En este sentido, estudios epidemiológicos y clínicos realizados en humanos han mostrado que el retraso en el crecimiento intrauterino se asocia al desarrollo de diabetes tipo 2 en edad adulta. El factor clave en esta asociación es un daño en el desarrollo de las células beta pancreáticas sin embargo, se desconoce el papel de las células alfa en este contexto. En este trabajo hemos investigado el efecto de la subnutrición global sobre la funcionalidad y ontogenia de las células alfa y beta desde el periodo fetal hasta la edad adulta. Para ello, ratas Wistar fueron sometidas a restricción proteico- calórica desde el día 14 de gestación y la restricción se extendió hasta la edad adulta. Los experimentos se realizaron en fetos a término, neonatos de 4,14 y 23 días de vida y en periodo adulto. La masa de células alfa y beta, neogénesis, replicación y apoptosis de las mismas se estudió por inmunohistoquímica y morfometría. La secreción de glucagón e insulina se analizó en islotes aislados por incubación estática y posterior RIA. Nuestros resultados muestran que la restricción proteico- calórica no afectó las características estructurales del islote, si bien la capacidad de adaptación a la falta de nutrientes es diferente en las células alfa y beta. Este proceso adaptativo podría ser crucial para la supervivencia durante esas etapas de escasez, pero perjudicial en el caso de una dieta normal o de sobrealimentación.

Nota: Agradecimientos: MEC (BFU 2008-02930) y CIBERDEM (ISCIII).

R07r-5

Implicación de la fosfolipasa A2 en la etiopatogenia del distrés respiratorio del neonato asociado a la colestasis gestacional

Elisa Herráez Aguilar¹, Rocio I. Rodríguez Macías², Elisa Lozano Esteban¹, Evelyn Poli¹, Daniel de Luca³ y Jose Juan Garcia Marin²

¹Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Laboratorio de Hepatología

R07-4

La subnutrición materna altera el desarrollo y funcionalidad del páncreas endocrino de la descendencia

Elisa Fernández-Millán¹, Juan de Toro-Martín², Esther Lizarraga-Mollinedo¹, Fernando Escrivá Pons³ y Carmen Álvarez Escolá³

Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ³PICU and Laboratory of Clinical Molecular Biology, University Hospital "A. Gemelli", Catholic University of the Sacred Heart, Roma (Italy)

Introducción: La acumulación de ácidos biliares (AB) en la colestasis de la embarazada se ha asociado con el síndrome de distrés respiratorio del neonato.

Objetivo: Estudiar el papel de la fosfolipasa A2 (FLasa-A2) en esta asociación.

Métodos: Se impuso una colestasis obstructiva en ratas el día 14 de la gestación. Las muestras se recogieron a término. La colanemia se determinó enzimáticamente y la distribución tisular de AB tras administrar [3H]-taurocolato i.p. a las madres. La expresión génica se estudió por RT-QPCR, WB e inmunofluorescencia.

Resultados: Se observó un aumento de los niveles de ABs en el tejido pulmonar de ratas colestáticas (x10) y sus fetos (x2). Se detectaron ABs en el espacio alveolar, que eran más elevados (x5) en el grupo con colestasis. Esta acumulación se relacionó con cambios en la expresión de FLasa-A2 en el pulmón de madres (x2) y fetos (x3), así como con alteraciones estructurales pulmonares y un proceso inflamatorio, con aumento del número de neutrófilos y macrófagos, formación de edema, y producción de citoquinas. Estos cambios probablemente se debían a un aumento de la actividad FLasa-A2, lo que favorece la degradación del surfactante y la aparición de mediadores de inflamación. La determinación de la expresión de eritropoyetina como medida indirecta de la función pulmonar reveló un aumento (x2) en el tejido hepático y renal de neonatos (5 días) de madres colestáticas. La administración i.p. a las madres 48 h antes del parto de un inhibidor específico de la FLasa-A2 palió las alteraciones estructurales y la respuesta inflamatoria observadas en sus fetos.

Conclusión: La acumulación de AB en el pulmón desencadena una respuesta inflamatoria y la degradación del surfactante al inducir la expresión de FLasa-A2 y favorecer su actividad.

El síndrome de Down (SD) es una enfermedad genética caracterizada por la presencia del cromosoma 21 parcialmente triplicado. Esta organización molecular condiciona la estructura y función del cerebro e influye sobre el aprendizaje y la conducta de las personas afectadas. El ácido oleico es un factor neurotrófico que induce la diferenciación neuronal. Las anomalías observadas en el cerebro de las personas con SD tienen su origen probablemente durante la embriogénesis. Así, nos propusimos estudiar el origen de estas anomalías utilizando líneas celulares inmortales derivadas del cerebro de animales normales (CNh) y células con trisomía en el cromosoma 16 (CTb). Los resultados nos indican que el ácido graso promueve la agrupación celular en la línea CNh, efecto que no se observa en ausencia de ácido oleico. Dicha agrupación celular no se observa en la línea CTb a los tres días de cultivo, sin embargo, tiene lugar posteriormente, lo que sugiere que el efecto del ácido oleico en la línea de trisomía está retrasada con respecto a la situación normal. Además, analizamos la viabilidad celular para confirmar que el efecto del ácido oleico no era debido a un incremento en el número de células y observamos, que a lo largo del cultivo aumenta la proliferación celular, pero no hay diferencias significativas entre las dos líneas celulares. A continuación, analizamos la expresión de la colina acetiltransferasa, observando un aumento en su expresión en las células CNh. Sin embargo, en las células CTb, la expresión de colina acetiltransferasa no se modifica por la presencia de ácido oleico. Por tanto, podemos sugerir que el comportamiento del ácido oleico es diferente en las células con trisomía, que nos lleva a estudiar el mecanismo implicado en este proceso.

R08. Bioquímica y Biología Molecular de Plantas

R08-1

Control hormonal de la fructificación en *Arabidopsis*

Cristina Urbez, Carolina Gallego-Giraldo, Raquel Sacristán, Francisco Vera-Sirera, María Dolores Gómez, Juan Carbonell y Miguel Pérez Amador
IBMCP (CSIC-UPV), Valencia

La fructificación es la activación del programa de desarrollo que convierte el pistilo en un fruto. Se inicia normalmente por la fertilización de los óvulos, que promueve una cascada de señales hormonales que resulta

R07r-6

La agrupación celular promovida por el ácido oleico, está disminuida en un modelo celular de síndrome de Down.

Maruan Hijazi Vega, Arantxa Tabernero Urbieto, José María Medina Jiménez y Ana Velasco Criado
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca, Salamanca

en la activación coordinada de los programas de desarrollo de la semilla y el fruto. Nosotros estamos interesados en conocer el mecanismo molecular por el cual las hormonas giberelinas (GA) controlan la fructificación en *Arabidopsis*. Una de las primeras etapas implica la acumulación de auxina en los óvulos fertilizados y la consiguiente activación de la síntesis de GAs en óvulos. Las GA son percibidas por tres receptores de la familia GID1: GID1a, que se localiza tanto en óvulo como en valva; GID1b, que se expresa exclusivamente en óvulo; y GID1c, que se expresa en valva. La acción combinada de GID1a y GID1c es la responsable de la percepción de GA en la valva y, por tanto, la que inicia la señalización que promueve la elongación del fruto. Por otro lado, en ausencia de fertilización, la señalización por GA está bloqueada por la acción de GAI, RGA, RGL1 y RGL2, las cuatro proteínas reguladoras negativas de la familia DELLA implicadas en la fructificación. La síntesis y percepción de GA promueve la degradación de las proteínas DELLA, permitiendo la activación de la red de regulación transcripcional aguas abajo que será responsable del inicio de los procesos regulados por GA. Hemos comprobado que solo el mutante cuádruple en estas proteínas es partenocárpico (muestra fructificación independiente de fertilización). Además, las cuatro DELLA presentan, al igual que los receptores GID1, un patrón espacial de expresión que permite deducir funciones diferentes para cada una de ellas durante la coordinación del desarrollo y crecimiento de semillas y frutos.

R08-2

Bioingeniería de la biomasa lignocelulósica en maíz

Silvia Fornalé¹, Montserrat Capellades¹, Antonio Encina², Joan Rigau¹ y David Caparrós-Ruiz¹

¹Laboratori de Genètica Molecular. Centre de Recerca en AgriGenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB, Cerdanyola del Vallès, ²Àrea de Fisiologia Vegetal, Universidad de León, León

La lignina es un polímero esencial en las plantas vasculares. Este compuesto fenólico se localiza en las paredes celulares secundarias de los tejidos vascular y mecánico e incrementa la hidrofobicidad de los conductos xilemáticos, aporta rigidez a las fibras y actúa como barrera física contra ataques patógenos. Los componentes básicos de la lignina se sintetizan a través de la ruta de los fenilpropanoides y corresponden a los alcoholes *p*-hidroxifenil (H), guaiaicil (G) y siringil (S). Finalmente, estos alcoholes son transportados a la pared celular donde son polimerizados para generar la lignina. Actualmente, la biomasa lignocelulósica de cereales tales como el maíz se considera un residuo agrícola debido a la interacción covalente de la

lignina con los polisacáridos de la pared. Esta interacción dificulta el acceso a los polisacáridos reduciendo el valor nutricional del forraje así como su valor energético para la producción de bioetanol celulósico. En esta presentación se muestra el efecto de la represión de diferentes genes implicados en la síntesis de la lignina en plantas transgénicas de maíz. Los resultados obtenidos aportan nuevos datos funcionales acerca de los mecanismos de síntesis y regulación del polímero de lignina, así como de los efectos producidos sobre los polisacáridos de la pared. Finalmente, se presenta una planta transgénica de maíz cuya biomasa lignocelulósica produce un incremento de la producción de bioetanol celulósico sin alterar su capacidad de crecimiento y desarrollo.

R08-3

La S-nitrosilación como mecanismo de señalización en plantas: caracterización funcional del nitrosoproteoma del peroxisoma

María C. Romero-Puertas, Ana P. Ortega-Galisteo, María Rodríguez-Serrano, Diana Pazmino, Dharmendra Gupta y Luisa M. Sandalio
Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada

Los peroxisomas son orgánulos que poseen una membrana simple, presentan un tipo de metabolismo esencialmente oxidativo y tienen un papel fundamental en la respuesta de la planta al estrés, tanto biótico como abiótico. Recientemente, se ha descrito además, la presencia de óxido nítrico (NO) en el peroxisoma lo que abre la posibilidad de nuevas funciones para estos orgánulos ya que el NO es capaz de regular diferentes procesos biológicos mediante la modificación directa de proteínas [1].

En este trabajo se ha descrito la existencia de procesos de S-nitrosilación de proteínas en peroxisomas de hojas de guisante. Las proteínas diana de esta modificación se han identificado mediante dos técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF and 2DnLC-MS/MS), obteniéndose seis proteínas relacionadas con la fotorrespiración, β -oxidación y detoxificación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Se ha analizado el efecto de la S-nitrosilación sobre tres de estas proteínas, la catalasa (CAT), la glicolato oxidasa (GOX) y la malato deshidrogenasa (MDH). El metabolismo del NO y el patrón de S-nitrosilación se ha analizado en extractos de hoja de plantas de guisante sometidas a dos tipos de estrés abiótico, el Cd y el 2,4-D. Aunque ambos tratamientos reducen la producción de NO, en el tratamiento con el herbicida se observa un incremento de la S-nitrosilación de proteínas posiblemente debido a un incremento de la actividad

GSNOR. El patrón de S-nitrosilación de las enzimas CAT y GOX durante ambos tipos de estrés relaciona esta modificación con la regulación del H₂O₂ en respuesta al estrés. Finalmente, se discutirá la relevancia de la S-nitrosilación y el papel de los peroxisomas en condiciones fisiológicas y patofisiológicas.

[1] del Río, LA: Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch Biochem Biophys* 2011; 506: 1-11.

Nota: Financiado por Marie Curie Actions-European re-integration Grants (FP7-PEOPLE-2007-2-2-ERG; Project nº 208146), por el proyecto PIE del CSIC (proyecto 2007401017) y por el proyecto cofinanciado por fondos FEDER (BIO2008-04067) del MICINN, España.

R08-4

Auxin-oxylipin crosstalk in stress responses of plant roots

Stephan Pollmann

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, UPM-INIA (CBGP), Pozuelo de Alarcón

Phytohormones regulate a wide array of developmental processes throughout the life cycle of plants. Over recent years, mounting evidence led to the widely accepted concept that plant hormone action is not the read-out of linear pathways, but determined by the extensive combinatorial activity of the signaling molecules and the integration of their signaling pathways, both in terms of regulating growth and development and in adapting to external stimuli. Recent work is beginning to shed light on the crosstalk of both nominally synergistically and antagonistically acting plant hormones such as, for example, auxins with oxylipins. Here, we report that oxylipins directly contribute to the regulation of the expression of two *Arabidopsis YUCCA* (*YUC*) genes, *YUC8* and *YUC9*. Similar to previously characterized *YUC* family members, we identify both *YUC8* and *YUC9* as involved in local auxin biosynthesis, as demonstrated by the altered auxin contents and auxin-dependent phenotypes displayed by loss-of function mutants and transgenic overexpressing lines. Gene expression data obtained by qPCR analysis and microscopic examination of promoter-reporter lines reveal an oxylipin-mediated regulation of *YUC9* expression that is dependent on the COI1 signal transduction pathway. The microscopic data indicate a functional overlap of the two analyzed auxin biosynthesis genes, but also point out specific functions for *YUC8* and *YUC9*, which are in part related to different spatio-temporal expression pattern. In support of these findings, the analyzed *yuc* knockout mutants had lower free auxin contents and displayed a

reduced response to oxylipins. This work provides evidence of a molecular mechanism that links oxylipin signaling with auxin homeostasis.

R08-5

Characterization of the SnRK1 complex involved in osmotic response

Agnese Rabissi, Cristina López Paz, Belmiro Vilela, Montserrat Pagès y Victoria Lumbreras
CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica). Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Bellaterra - Cerdanyola del Vallès

Reversible phosphorylation plays a central role in the regulation of a high number of cellular processes. The SnRK1/AMPK protein kinase family regulates biological responses to environmental and nutritional stress in eukaryotes. In plants, SnRK1 kinases are highly conserved and play a central role in linking metabolic and stress signaling responses in a way does not occur in other organisms. For these putative roles we focus on the characterization of this complex in maize as a potential candidate to design new strategies for the development of drought/abiotic-resistant crops. The SnRK1 complex is formed in plants by three subunits: The catalytic subunits or SnRK1, the regulatory subunits AKINbg and the beta subunits. In maize, our results indicate that AKINbg was readily detected in both nucleus and cytoplasm. In the case of SnRK1 subunits, we observed a common pattern of cytoplasmic accumulation in large inclusion of both proteins and only SnRK1b, the specific subunit of cereals, was found at significant levels within the nucleus. We are now extending these localization studies to the other subunits and to the complex; in particular, we will focus in understand how beta subunits are involved in the re-localization of the complex in response to osmotic and metabolic stress and the specific subunits that participate in this response. In parallel, to know more about how SnRK1 participates in the re-programmation of the cellular response to a drought situation we took a yeast two-hybrid approach using SnRK1b as bait against a library of drought stressed leaves. This technique yielded different potential targets involved in carbon/ROS metabolism and we started to further characterize a MnSOD protein. We are currently characterizing this protein.

R08-6

Identificación, aislamiento y caracterización de lectinas presentes en el látex de *Euphorbia trigona*

Judith Villanueva¹, Luis Manuel Quirós² y Sonia Castañón¹

¹Departamento de Biotecnología. Neiker Tecnalia - Centro de Arkaute, Arkaute, ²Dpto. de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Oviedo

Las lectinas son proteínas que se caracterizan por su unión reversible a azúcares y porque presentan un origen no inmune. Estas proteínas juegan un papel crucial en numerosos procesos biológicos como el tráfico intra e intercelular de glicoconjugados y el reconocimiento y comunicación entre células. Una fuente especialmente rica en lectinas es el látex de las plantas de la familia *Euphorbiaceae*. Mediante cromatografía de intercambio aniónico se purificaron tres lectinas entre las proteínas mayoritarias del látex de *Euphorbia*. En estudios realizados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras se obtuvieron bandas entre 31-34 kDa mientras que, en condiciones no reductoras, se obtuvieron bandas entre 27-31 kDa, lo que implica la presencia de enlaces disulfuro intracatenarios. El peso molecular nativo aparente de las proteínas determinado mediante cromatografía de exclusión molecular fue entre 59-73 kDa de donde se dedujo que las lectinas son dímeros. Las lectinas purificadas a partir de *Euphorbia* hemaglutinaron eritrocitos humanos de todos los grupos sanguíneos. El estudio de inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos demostró que estas proteínas presentaban afinidad por azúcares derivados de galactosa. Mediante citometría de flujo se observó que tras el tratamiento de diferentes líneas tumorales con estas lectinas dichas células entraban en apoptosis. Por el contrario, el tratamiento de fibroblastos con estas mismas proteínas no producía el mismo efecto.

Estas lectinas purificadas pertenecían al grupo RIP tipo II al inhibir la síntesis proteica en un sistema libre de células.

Nota: Proyecto financiado por el Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, Gobierno Vasco (GV-EJ).

R08-7

Marcadores bioquímicos del proceso de embriogénesis somática en *Solanum tuberosum* cultivar granola

Renaldo José Salazar Fernández de Gamarra y Maira Oropeza

Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela, Caracas (Venezuela)

Uno de los procesos in vitro más utilizados en papa con fines principales en la propagación y mejoramiento genético es la embriogénesis somática. El uso y estudio de marcadores bioquímicos, y en particular de patrones isoenzimáticos en este proceso, permitiría determinar el potencial embriogénico. En el caso de papa, existe poca información de la función de peroxidases, esterases, fosfatasas ácidas, leucina aminopeptidasas y proteasas involucradas en los estados de este proceso. En este trabajo, nosotros determinamos patrones isoenzimáticos en dos etapas importantes de este proceso en *Solanum tuberosum* cultivar granola: una primera etapa de callo embriogénico de 30 días de cultivo en un medio con altas concentraciones de auxinas (2,4 - D) y una segunda etapa de 90 días de cultivo con formación de embriones en un medio suplementado con bajas concentraciones de auxinas (AIA) y suplementados con citocininas (Z) y ácido giberélico (GA3). Nuestros resultados muestran diferentes patrones isoenzimáticos entre las dos etapas establecidas, encontrando las mayores actividades isoenzimáticas, así como una banda esterasa (E5), una banda de fosfatasa ácida (FA4) y una banda de proteasas de 150 KDa en la etapa de 90 días de cultivo, ausentes en los patrones de la etapa de 30 días de cultivo, los cuales son posibles marcadores bioquímicos de este proceso en papa. Estos resultados indican que estos marcadores cumplen funciones en los procesos de elongación celular de la pared celular, traducción de señales, estrés oxidativo y muerte celular programada en el proceso de embriogénesis somática en papa, sin embargo, estudios más detallados deben ser realizados para llegar a estas conclusiones.

R09. Enseñanza de la Bioquímica

R09-1

Congreso Virtual de Bioquímica en Grados de Ciencias de la Salud: motivación y participación de los alumnos en la realización del póster. Diferencias de enfoque

Rosa Olmo López¹, Antonio Luis Villarino Marin², Pilar Mayor de la Torre¹, Pilar Cano Barquilla¹ y José María Teijón Rivera¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Departamento de Enfermería. E.U. Enfermería, Fisioterapia y Podología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

La idea de presentar un Congreso Virtual de Bioquímica surgió de la necesidad de introducir una experiencia innovadora para estudiantes de diferentes Grados de Ciencias de la Salud que comparten una formación básica en Bioquímica, de forma que se potencie el trabajo activo del estudiante y la capacidad de trabajar en grupo, siendo muy importante el hecho de que al pertenecer a distintos Grados dentro del área, se favorece una visión de la asignatura desde diferentes enfoques que a su vez son complementarios entre sí.

Podían participar en el Congreso 692 alumnos, los cuales se dividieron en grupos de 5-10 según las titulaciones. Las normas para la realización de los póster fueron las mismas para todos, pero se pidió a los alumnos que hicieran especial hincapié en la importancia del tema elegido en su titulación. Los grupos de trabajo fueron elegidos por los alumnos, y en la mayoría de los casos se les permitió también la elección del simposio y del tema del póster. La acogida por parte de los alumnos fue excelente, independientemente de la valoración asignada a esta actividad por los profesores. Así los porcentajes de participación fueron: 75,6% en Enfermería, 60,9% en Fisioterapia, 77,6% en Medicina, 79,7% en Odontología y 85,4 en Podología. La calidad científica y estética de los trabajos fue buena, sin embargo, el enfoque del póster en relación con su titulación solo fue bastante específico en los Grados de Odontología y Podología. Además, esta actividad permitió a los alumnos, de primer curso en todos los Grados, familiarizarse con las búsquedas bibliográficas.

Nota: Agradecimientos: PIMCD 2010/2011 n° 99 de la UCM.

R09-2

Reuniones internacionales en el marco de proyectos europeos: una actividad formativa de interés para estudiantes de máster y doctorado

Andreu Palou Oliver, Ana M. Rodríguez Guerrero, Francisca Serra Vich, Catalina Picó Segura, Luisa Bonet Piña, Paula Oliver Vara, Joan Ribot Riutort, Juana Sánchez Roig y Teresa Priego Cuadra
Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (Nutrigenómica). Universitat de les Illes Balears (UIB) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Palma de Mallorca

Con la nueva filosofía del Espacio Europeo de Educación Superior, en la que el profesor facilita a los estudiantes conocimientos y estrategias para desarrollar su formación y posterior desempeño laboral, la integración de alumnos de postgrado (máster y doctorado) en *meetings/workshops* internacionales, por ejemplo en el marco de proyectos europeos, puede ayudar a abrirles horizontes y desarrollar competencias específicas de cara a su formación como profesionales en un entorno de investigación internacional.

Con este objetivo, en el contexto del Máster Universitario de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada y del Doctorado del mismo nombre, se programó la participación activa de los alumnos como asistentes y/o colaboradores en las tareas de organización de los *workshops* MITOFOOD (2009) (COST Action FA0602) y I BIOCLAIMS Symposium (2010) (ECGA núm. 244995).

En estas dos convocatorias, los estudiantes tomaron parte en las actividades científicas de ambos *workshops*, asistiendo a las conferencias/comunicaciones orales, desarrollando su expresión y comprensión científica en lengua inglesa y participando activamente en las sesiones de discusión de pósters. Los alumnos de doctorado, además, se integraron en tareas de organización y asistencia técnica de ambos *meetings*.

La experiencia de integración de alumnos de postgrado en la asistencia/organización de *workshops* relacionados con proyectos europeos ha tenido un gran éxito entre los estudiantes. Supone una actividad diferente, valiosa y útil para su formación como futuros investigadores (en entidades públicas y privadas), y les permite acercarse de forma práctica a la realidad de la investigación internacional de calidad, así como establecer un primer contacto con investigadores de distintas nacionalidades.

R09m-3

Bioinformática y medicina molecular: caso de formación mediante tecnologías aplicadas en biología molecular computacional dirigido hacia el contexto clínico en España

Allan Orozco

Spanish National Bioinformatics Institute, Spanish National Cancer Research Centre, CNIO, Madrid

El Instituto Nacional de Bioinformática (INB) es una plataforma tecnológica financiada por el Instituto de Salud Carlos III que está organizada como una red constituida por 10 nodos y un nodo central, localizado en el CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas), especializados en diferentes áreas de la bioinformática en España. Su principal objetivo es proporcionar soporte y servicios bioinformáticos aplicados a los diferentes proyectos en genómica, proteómica y medicina molecular en el ámbito nacional e internacional. De manera adicional, mediante su catálogo tecnológico disponible, efectúa acciones de formación especializada en temáticas que integran la bioinformática y biología computacional. Desde el 2009, el INB (Instituto Nacional de Bioinformática, www.inab.org) participa de forma asociada con el Ciberbbn (Centro de Investigación Biomédica en Fisiología, Obesidad y Nutrición), Fundación IMABIS y con el Ciberbbn (Centro de Investigación Biomédica en Bioingeniería y Nanomedicina) de España, en un programa nacional de formación en bioinformática aplicada en medicina genómica cuyo principal propósito es formar a especialistas del sector clínico provenientes de áreas como la medicina, bioquímica, biología molecular, genética, nanomedicina, etc. Actualmente, han participado más de 400 profesionales provenientes de 30 hospitales nacionales y se han realizado siete cursos acreditados en las siguientes localidades: Hospital Reina Sofía de Córdoba, Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, Hospital Sant Pau de Barcelona, Hospital Ramón y Cajal y Hospital La Paz en Madrid. Finalmente, la misma actividad formativa del INB, en términos de educación y capacitación, es uno de los mayores ejemplos europeos de bioinformática aplicada en la genómica clínica.

R09-4

Creación del BQ-TRIVIAL: una actividad ECTS

Pilar Roca Salom, Jordi Oliver Oliver y Francisco José García Palmer

Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca

El juego contribuye a desarrollar la imaginación, el espíritu constructivo, y hasta la facultad de sistematizar, pero, además, puede ayudar más directamente a la ciencia, como técnica docente. A nivel universitario su uso prácticamente no existe, aunque los estudiantes si realizan muchas actividades lúdicas fuera del aula con gran interés, p.e. ajedrez y otros juegos de mesa, sin dejar de mencionar juegos de acción o estrategia en ordenadores.

La finalidad del proyecto fue que los alumnos del grado de Bioquímica de la UIB participasen en la preparación y diseño de un juego de trivial, BQ-TRIVIAL. Este juego se implementó en el espacio cooperativo del grado de Bioquímica, de manera que los alumnos tanto actuales como futuros del grado puedan utilizarlo como herramienta de aprendizaje de las diferentes materias de la Bioquímica y Biología Molecular.

El juego se presentó a los alumnos del grado de Bioquímica y se realizó la competición como una de las actividades del día de la Bioquímica de la UIB.

El proyecto ha contribuido:

- A fomentar la creatividad y la curiosidad científica.
- A apoyar y reforzar el proceso de aprendizaje y de evaluación.
- A animar al trabajo en equipo de los alumnos del grado de Bioquímica.
- A iniciar a los alumnos que en la búsqueda y formulación de preguntas sobre los contenidos del grado de Bioquímica.
- A estimular al alumno para compartir conocimientos y participar en el desarrollo de la práctica docente.
- A reforzar el conocimiento en Bioquímica y Biología Molecular utilizando BQ-TRIVIAL como herramienta docente.

Nota: Proyecto innovación docente ICE-UIB.

R09-5

Creación de una plataforma para la enseñanza y aprendizaje de la Bioquímica y de la Biología Molecular y Celular (BBMC) en entornos web 2.0 y 3.0

María Jesús Miró Obradors¹, Beatriz Barrero Díaz², Evangelina Palacios Alaiz¹, María Teresa Méndez Marco¹, Rafaela Raposo González³, Jose María Sordo Juanena⁴, Jesús Osada García⁵ y Ángel Herráez Sánchez⁶

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Universidad para los mayores. Vicerrectorado de Atención a la Comunidad

Universitaria. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ³Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ⁴Departamento de Didáctica de las Matemáticas. Facultad de Educación. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ⁵Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ⁶Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid

Con el término Web 2.0, O'Reilly (2003) comienza una nueva concepción de Internet, dónde la unidireccionalidad se sustituye por la interacción entre usuarios y las tecnologías sociales en las que se opina, comparte, colabora y crea "conocimiento social"

Antecedentes: Nuestro grupo de innovación educativa (profesores de distintas Facultades y Universidades), ha desarrollado desde 2005 hasta la fecha, varios PIMCD-UCM: virtualización de asignaturas, materiales multimedia, redes temáticas y diseño de sitios web con bases de datos MySQL y PHP (mensajeros lipídicos; preguntas/respuestas en BBMC).

Objetivo: Crear una plataforma para la enseñanza y el aprendizaje de "BBMC" que apoyándose en la tecnología Web 2.0 y 3.0, permita generar: a) una comunidad de usuarios (profesores, estudiantes, etc) afines a este área de conocimiento y b) un entorno interactivo en el que dicha comunidad participe activamente en la construcción del conocimiento.

Resultados y metodología: 1) COMUNIDAD "BBMC" EN "GNOSS" (espacio web desarrollado por RIAM I+L Lab en el que convergen las tecnologías de la web semántica 3.0 y la web social). En este contexto, hemos asignado a dicha comunidad, las etiquetas y categorías que permiten su conexión con otros grupos y clasifican los recursos a compartir (archivo, URL, nota, artículo wiki, etc). El software de GNOSS facilita la rápida incorporación y localización de los mismos, así como la comunicación e intercambio de opiniones (preguntas, encuestas, debates) entre los usuarios de un colectivo con intereses comunes. 2) SITIO WEB DINÁMICO diseñado en un Hosting Joomla en el que hemos centralizado una base de datos para que sus contenidos en BBMC (preguntas y otros materiales), sean incorporados progresivamente por la comunidad.

Nota: PIMCD 2010-11 n°252

R09-6

El Club de los Jóvenes Bioquímicos (ITUs-Club)

Josep M. Fernández-Novell¹ y Joan J. Guinovart²

¹Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Institut of Research in Biomedicine, IRB, Barcelona

El curso 2010-2011 ha finalizado con la celebración del 15º "I tu? Jo, Bioquímica", todo han sido felicitaciones. Durante los primeros 10 años de se hizo el seguimiento del alumnado pero no era suficiente. ¿Cómo organizar, dinamizar y reunir a todo este talento enfocado hacia la bioquímica? Organizando de la 1ª reunión de antiguos participantes del curso que denominamos "ITUs-Club", hace ya más de 4 años. Esta reunión llevó a la realización de otras 2-3 cada año a las que asiste una buena representación de cada curso. El orden del día abarca desde conferencias dadas por los propios participantes (algunos han terminado su carrera, doctorado o posdoct) donde exponen los resultados de sus investigaciones, hasta mesas redondas donde discutir los problemas con los planes de Bolonia o los nuevos grados. En cada reunión se edita un boletín y en la última del verano del 2011 se ha inaugurado la web del ITUs-Club. Los buenos resultados obtenidos se basan en la buena relación surgida entre los propios asistentes, relación con un objetivo común, la bioquímica. Creemos que clubes como éste deberían crecer en todo el ámbito universitario nacional.

R09-7

Congreso Virtual de Bioquímica en distintos Grados de Ciencias de la Salud: Otras formas de adquisición de conocimientos y de autoevaluación de los mismos

César Teijón López¹, Alfonso Martínez-Conde Ibáñez², Paloma Posada Moreno¹, Ana Isabel Esquifino Parras² y María Dolores Blanco Gaitán²

¹Departamento de Enfermería. E.U. Enfermería, Fisioterapia y Podología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Uno de los grandes planteamientos metodológicos actuales es fomentar una forma de adquisición de conocimientos en donde el profesor no sea la única persona que imparta docencia, sino que el alumno aprenda de su propio trabajo y del realizado por sus compañeros. También es importante que los estudiantes adquieran la capacidad de autoevaluar el trabajo realizado, observando las virtudes y carencias del

mismo, así como que aprendan y evalúen el trabajo realizado por sus compañeros, como una forma de mejorar los trabajos que realicen con posterioridad. Por ello en este trabajo de innovación se propuso que tras la realización de un póster para un Congreso Virtual de Bioquímica de distintos grados de Ciencias de la Salud (enfermería, fisioterapia, medicina, odontología y podología) los alumnos propusieran una serie de preguntas sobre su póster. Los profesores eligieron 20 test de los propuestos, la elección se realizó de forma que para la contestación de las mismas fuera necesario leerse los póster y abarcando a las distintas titulaciones implicadas. Esas preguntas fueron planteadas en la página virtual en la que se realizaba el Congreso. En este caso la participación sí estuvo influida por como eran valoradas por cada profesor las respuestas emitidas, estando comprendida entre un 28% y un 89% según la titulación. Para que los alumnos valoraran el trabajo realizado por sus compañeros también se les propuso que votaran de forma individual al póster que para ellos tenía la mejor calidad a nivel científico y a nivel estético, en este caso el rellenar la encuesta no tenía ningún reflejo en la nota, sin embargo, fue contestada por la mayoría de los alumnos.

Nota: Agradecimientos: PIMCD 2010/2011 n°99 de la UCM.

R09-8

Una forma más divertida de aprender el ciclo de Krebs propuesta por los alumnos de 1º de Grado en Veterinaria

E. Carrasquer, I. Gil, N. Gracia y T. Muño-Blanco
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Piruvato es un chico producto de la glucólisis. Con estos antecedentes de degradación y una familia destruida, pierde a un amigo, un CO₂ que es casi parte de él. Se junta con un CoA, y pasa a llamarse Acetil CoA (AcetiA para los amigos). Necesita dinero (en forma de energía, claro) así que decide mudarse a la mitocondria, un nuevo barrio donde sin duda conseguirá lo que necesita, pero a un alto precio: es un barrio de la periferia, con malas compañías. El primero con el que entablará amistad será Oxalacetato, un chico del barrio muy trillado que comenzará la degradación de AcetiA, de forma irreversible. El negocio que hacen es una condensación, unen sus fuerzas y pasará a llamarse Citrato. Ya no hay vuelta atrás. A partir de aquí, todo irá cuesta abajo... Distintos personajes irán destruyendo poco a poco a AcetiA, (incluso perderá a otros 2 amigos CO₂),

hasta que una vez que ha conseguido todo el dinero posible, el barrio lo ha cambiado tanto que ahora es otro Oxalacetato, que ya no tiene nada que perder y estará esperando a que otro chico nuevo llegue al barrio para empezar otra vez la degradación. Siempre de la misma forma... siempre por dinero. Ya se sabe, estas cosas pasan todos los días miles de veces, en cientos de barrios mitocondriales en las ciudades celulares. El dinero... es el dinero. Tras conseguir el dinero hay que sacarlo del barrio, ya que el dinero en forma de sustancias ilegales como FADH y NADH debe blanquearse en la cadena respiratoria para pasarlo a ATP. Y así, toda la historia habrá acabado. Es interesante que por mucho mal que el ciclo de Krebs hiciera al Piruvato, es una ruta anfóbica ya que además de degradar a AcetiA proporciona precursores de biomoléculas ajenas al ciclo.

R10. Regulación Metabólica

R10-1

Estudio de la carnitina palmitoiltransferasa 1 como diana terapéutica de la obesidad

Dolores Serra Cucurull

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, IBUB, CIBERobn, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona

La obesidad es una patología que se ha convertido en un problema de salud pública. Por ello, estrategias dirigidas a aumentar el consumo energético o a reducir la ingesta calórica parecen adecuadas para su tratamiento. Las enzimas carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) son claves tanto en la oxidación de las grasas, como en el control de la ingesta. Nuestro grupo ha demostrado que una sobreexpresión a largo plazo en hígado de ratones alimentados con dieta grasa de la isoforma hepática de CPT1, CPT1A, o de un mutante permanentemente activo, CPT1AM, produce un aumento de la oxidación de los ácidos grasos en este tejido y protege del aumento de peso, del desarrollo de la obesidad y de la resistencia a la insulina. En ratones genéticamente obesos, una sobreexpresión de CPT1AM en hígado, reduce la esteatosis hepática y los niveles de glucosa e insulina en sangre. Por lo que se refiere al control de la ingesta, la CPT1 hipotalámica puede jugar un papel relevante. Hemos observado que la inhibición farmacológica de la CPT1 en hipotálamo de ratas conduce a una disminución de la ingesta y del peso. Mientras que la sobreexpresión de la

CPT1AM en este órgano produce un aumento de peso, hiperfagia, hiperglucemia e hiperinsulinemia. Todo ello indica que la modulación de la actividad de CPT1 y de la oxidación de ácidos grasos en distintos tejidos puede ser clave para un potencial tratamiento de la obesidad y de las patologías asociadas.

R10-2

La adenosina incrementa la expresión del gen *pfkfb3* a través de los receptores A2 y potencia el flujo glucolítico en macrófagos activados

Almudena Ruiz-García¹, Eva Monsalve¹, Àurea Navarro-Sabaté², Laura Novellasdemunt², Anna Manzano², Samuel Rivero¹, Jorge Laborda¹, Ramón Bartrons² y María José M. Díaz-Guerra¹

¹Facultad de Medicina, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Albacete, ²Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona - IDIBELL, Barcelona

La activación de los macrófagos a través de los receptores Toll incrementa la expresión de los receptores de adenosina A_{2A} y A_{2B}. La activación de estos receptores, tras el estímulo con lipopolisacáridos bacterianos (LPS), induce la expresión del gen *pfkfb3* que codifica el enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa tipo 3 (PFKFB3), lo que origina un incremento en los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), el principal regulador alostérico de la glucolisis. Utilizando RNA de interferencia y expresión diferencial de los receptores A_{2A} y A_{2B}, demostramos que los receptores A_{2A} median en parte la inducción del gen *pfkfb3* por LPS, mientras que los receptores A_{2B}, con menor afinidad por la adenosina, cooperan en la inducción cuando los niveles de adenosina son elevados. El análisis de la región promotora del gen *pfkfb3* mediante fragmentación secuencial, mutagénesis dirigida y el uso de RNA de interferencia nos indican que HIF1a es el factor de transcripción clave en la inducción del gen *pfkfb3* por LPS, mientras que la cooperación observada tras la activación con agonistas de los receptores A₂ depende de la actividad de Sp1.

Nuestros resultados muestran que además de sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, esenciales en el control de la activación de los macrófagos y la protección de los tejidos de los daños colaterales originados en este proceso, la adenosina, a través de sus receptores A₂ coopera con componentes bacterianos para aumentar la actividad del enzima PFKFB3, originando un incremento

en los niveles de Fru-2,6-P₂. Este proceso potencia el flujo glucolítico y la generación de ATP, lo que favorecería el desarrollo y el mantenimiento de las actividades defensivas y reparadoras de los macrófagos.

R10m-3

Role of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in insulin resistance and obesity

Sonia Fernández-Veledo¹, Lucía García-Guerra², Iria Nieto-Vazquez³, Rocio Vila-Bedmar⁴, María Jurado-Pueyo⁴, Cristina Murga⁴ y Federico Mayor Jr.⁴

¹Hospital Universitari Joan XXIII - IISPV - CIBERDEM, Tarragona, ²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, CIBERNED, Madrid, ³Universidad Complutense de Madrid, CIBERDEM, Madrid, ⁴Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

Prevalence of obesity has reached epidemic scope in industrialized countries and it currently stands as a risk factor for the development of common metabolic disorders as insulin resistance and T2D. Nowadays, GRK2 has been recognized as an integrative node regulating a variety of transduction pathways including the insulin signaling cascade. We have recently reported that GRK2 plays a relevant physiological role in the modulation of insulin responses in vivo. In cultured adipocytes and myocytes, increased GRK2 levels inhibit insulin-stimulated glucose uptake and signaling by a mechanism involving the formation of dynamic GRK2/IRS1 complexes. This work also uncovers a role for GRK2 in the regulation of adiposity since GRK2+/- mice were resistant to diet and age-induced obesity (García-Guerra et al., 2010). We further evaluated the potential contribution of brown fat to the leaner phenotype of GRK2+/- mice. Our results indicate that GRK2 modulate white and brown fat lipid metabolism. GRK2+/- adult mice exhibited increased energy expenditure and a lower RER, consistently with a less deteriorated BAT morphology. Indeed, decreased GRK2 protein levels were associated with higher core body temperature and a better thermogenic capacity. In addition, we detect a negative effect of GRK2 in the metabolism and differentiation of cultured brown adipocytic cells, further supporting the hypothesis that the lean phenotype of GRK2 +/- mice clearly involves a role for this kinase in BAT function. In summary, our data identify GRK2 as an important negative regulator of insulin effects and point at GRK2 inhibition as a potential tool for the enhancement of brown fat activity, which may have important therapeutic implications for the treatment of obesity and associated metabolic disorders.

R10-4

Characterization of the metabolic fluxes in the adipocyte differentiation process using bioinformatics tools

Silvia Marín¹, Anibal Miranda¹, Vitaly Selivanov¹, Sergio Rodríguez-Cuenca² y Marta Cascante¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Metabolic Research Laboratories, University of Cambridge, Cambridge (UK)

White adipose tissue mass is a critical factor determinant for obesity and associated health risks. The formation of new adipocytes from the differentiation of pre-adipocytes is accompanied with important metabolic changes. Stable isotope tracer data is used to reveal the metabolic flux profile in cells under studied conditions, and thus to provide an insight into the cell phenotype. The de novo adipocyte differentiation and the associated changes of metabolic flux profile were studied on the 3T3-L1 cell line incubated with stable isotope tracers. The use of a software simulating the measured data ensures the acquisition of more information and the elaboration of a metabolic map, taking into account all the available information throughout the differentiation process. Our results showed adipocytes present three distinct metabolic behaviors depending on the differentiation grade. Using the isotopologue data obtained in our experiments and our custom metabolic software Isodyn we quantified the metabolic flux distribution in the glucose metabolic network. This analysis allowed us to evaluate the dynamics of metabolic fluxes in the central carbon metabolism. The results are consistent with previous works in the field. Dramatic changes in glycogen accumulation were observed throughout the differentiation process, and a metabolic rearrange in anaplerotic pathways was observed. The analysis with Isodyn allows us to define the whole set of metabolic fluxes inside the cell, defining the changes in the metabolic phenotype during the differentiation process.

Note: Supported by: ETHERPATHS.

R10-5

A transcriptomic analysis of the white adipose tissue of p21 KO mice: New insights between cell cycle and metabolism

Giuseppe Pulice¹, Johan Tisserand¹, Mariana Teixeira¹ y Carme Caelles²

¹Cell Signaling Group, Molecular Medicine Program, IRB, Barcelona, ²Cell Signaling Group, Molecular

Medicine Program, IRB. Biochemistry and Molecular Biology Department, Pharmacy School, University of Barcelona, Barcelona

The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is implicated in obesity, as shown by previous experiments carried out in our laboratory. The expression of p21 was increased in the inguinal white adipose tissue (WAT-I) of obese mice and, consistently, the lack of p21 protected from the development of high fat diet induced obesity (DIO). A transcriptomic analysis comparing genes expressed in the WAT-I of mice wild type (WT) against heterozygous and knock out (KO) for p21 did not evidence any variation in the expression of adipogenic genes such as PPAR γ and C/EBP α . This indicates that the p21 deficiency does not modify the differentiation capacity of the adipocytes in vivo. Nonetheless, further analysis showed that the expression of the PGC1 α , master gene of mitochondrial biogenesis, is increased in the WAT-I of p21 KO mice in conditions of high fat diet. This resembles the phenotype of the adipose tissue-specific pRB KO mice and suggests that the action of p21 could be mediated by pRB.

R10m-6

The E3-SUMO ligase PIASy mediates SUMO-2 conjugation of AMP-activated protein kinase β 2 isoform

Teresa Rubio López, Pascual Sanz Bigorra y Santiago Vernia Miralles

Instituto de Biomedicina de Valencia/CSIC, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Valencia

AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) is a cellular energy sensor that exists in almost all eukaryotes. AMPK is a heterotrimer consisting of a catalytic α (α 1, α 2) subunit and two regulatory subunits, β (β 1, β 2) and γ (γ 1, γ 2, γ 3). AMPK is activated by an increasing cellular AMP: ATP ratio (which correlates with low energy levels) caused by metabolic stresses that interfere with ATP production or that accelerate ATP consumption. AMPK activation occurs by a dual mechanism that involves allosteric activation and phosphorylation by upstream kinases. This protein complex can be regulated by post-translational modifications, such as ubiquitination. In the present study we showed that AMPK is a target for SUMO (small ubiquitin-like modifier) modification (SUMOylation) a form of post-translational that occurs in a manner analogous to ubiquitination and requires a heterodimeric E1-activating enzyme, an E2-conjugating enzyme, and an E3 ligase, such as PIAS (protein inhibitor of activated STAT). Mammalian PIAS (protein inhibitor of activated STAT) protein family comprises four members: PIAS1, PIAS3, PIASx, and PIASy. They are implicated in fundamental cellular processes, including transcriptional regulation,

either through their action as E3 SUMO ligases or through SUMO-independent effects.

We report here the identification of AMPK as a new PIASy-interacting protein. We also report that overexpression of PIASy mediates SUMO-2 conjugation of AMPK β 2 isoform. This modification increases the activated state of the AMPK complex and leads to the accumulation of AMPK β 2 into cytoplasmic inclusion bodies which colocalized with SUMO-2. Together, our findings provide the first evidence of AMPK regulation by SUMO-2 conjugation.

R11. Biotecnología Molecular

R11-1

Oportunidades de ciencia traslacional en el entorno académico de farmacología

José M. Sánchez Puelles

Farmacología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid

Las tendencias económicas cambian los paradigmas, incluso, o podríamos decir aún más, en la ciencia. Los esfuerzos de investigación orientada realizados en el entorno académico, por instituciones públicas de investigación biomédica, son una alternativa necesaria al sector privado. El mundo académico posee una atmósfera científica creativa e innovadora, sobre todo perseverante y basada en la libertad de pensamiento del investigador. La libertad del investigador académico permite que se puedan asumir riesgos de investigación que son descartadas por la industria. En el presente congreso presentamos una iniciativa académica del CIB/CSIC en el área de descubrimiento de fármacos. Esta iniciativa tiene como característica el concepto de “investigación de alto riesgo” y, por lo tanto, los proyectos se encuentran en la frontera del nuevo conocimiento en *Drug Discovery*. Sin desviarse de la curiosidad académica intentamos solventar la necesidad clínica.

Drug discovery is generally done in the commercial rather than the academic setting. An attractive and greatly needed alternative to the current nearly exclusive role played by industry, is to enhance such R&D efforts in non-profit biomedical research institutions. Unquestionably, academia has a real atmosphere for creative and innovative science, assuming day-by-day research opportunities that are often ignored by the industry, as well as by its detailed and

imaginative, hypothesis-driven analysis of discovery problems. CIB-consortium is a joint venture among multidisciplinary academic labs with broad experience in the academia and in the industrial research sector. We pursue to combine a solid forward and reverse chemical genomic strategies by providing scientific innovative research efforts.

R11-2

Dendrímeros que emulan proteínas portadoras. Proceso de reconocimiento de inmunoglobulinas

Antonio Jesús Ruiz-Sánchez¹, Ezequiel Pérez-Inestrosa¹, María Isabel Montañez², María José Torres² y Cristobalina Mayorga²

¹*Departamento Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga,*

²*Laboratorio de Investigación, Fundación IMABIS-Hospital Carlos Haya, Málaga*

Los antibióticos β -lactámicos tienen que conjugarse con proteínas portadoras para inducir anticuerpos específicos tipo IgE. El grupo bencilpeniciloilo (BPO) es el determinante mayor, responsable de las respuestas alérgicas a bencilpenicilina. La alergia a antibióticos β -lactámicos es un problema clínico ampliamente conocido, pero el uso de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para detectar anticuerpos IgE dirigidos a β -lactamas no son muy sensibles. Ante la necesidad de mejorar estas técnicas *in vitro* e *in vivo*, nuestro objetivo principal es preparar conjugados hapteno-portador capaces de reproducir el proceso de reconocimiento molecular implicado en el sistema inmunológico, utilizando dendrímeros tipo PAMAM que emulen a las proteínas portadoras[1]. En este sentido, hemos desarrollado un método conveniente para conjugar dendrímeros PAMAM de diferentes generaciones (Gn, n=0-6) con grupos peniciloilos en la superficie y su posterior evaluación en pruebas de inhibición de RAST con muestras de sueros de pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos [2].

Por otro lado, y con el objetivo de poder evaluar la aptitud de estos conjugados para pruebas *in vitro* tipo RAST, se ha desarrollado una metodología [3] para sintetizar dendrímeros PAMAM soportados sobre una fase sólida y conteniendo grupos BPO en su superficie.

[1] Sánchez-Sancho F, Perez-Inestrosa E, Suau R, Mayorga C, Torres MJ, Blanca M. *Bioconjugate Chem* 2002;13: 647.

[2] Blanca M, Torres MJ, Mayorga C, Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, Juarez C. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 261.

[3] Patente: Perez-Inestrosa E, Suau R, Blanca M, Montañez MI, Mayorga C, Torres MJ. Pat N°: P200302737.

R11-3

Polihidroxicanoato despolimerasas de origen bacteriano: propiedades y aplicaciones en biotecnología

Marta Santos, Joana Gangoiti, María Jesús Llama y Juan Luis Serra

Grupo de Tecnología Enzimática y Celular.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa

Los poli(R)-hidroxicanoatos (PHA), son polímeros de reserva que acumulan muchos microorganismos en situaciones de estrés nutricional. Los PHA pueden ser de cadena corta (SCL, con monómeros de 3-5 C) o media (MCL, con monómeros de 6-14 C). La biodegradación de PHA en el medio externo es catalizada por PHA despolimerasas extracelulares. A partir de la actividad de estas enzimas pueden obtenerse hidroxicanoatos quirales, monómeros de gran interés en farmacia y biomedicina. Hasta ahora, son pocos los microorganismos productores de MCL-PHA despolimerasas extracelulares descritos, siendo la mayoría de ellos bacterias Gram-negativas pertenecientes en su mayoría al género *Pseudomonas*. De entre las MCL-PHA despolimerasas caracterizadas, destaca la poli(3-hidroxiocanoato) [P(3HO)] despolimerasa de *Pseudomonas fluorescens* GK13, primera en ser purificada y caracterizada a nivel molecular.

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un método para purificar e inmovilizar el enzima de *P. fluorescens* GK13 en un solo paso a partir del caldo de cultivo. De este modo, se ha comprobado que la despolimerasa de *P. fluorescens* GK13 así inmovilizada es un excelente catalizador para hidrolizar P(3HO) en monómeros quirales. Además, este enzima se ha utilizado como modelo en el estudio de nuevas MCL-PHA despolimerasas aisladas en nuestro laboratorio. En concreto nuestro trabajo se ha centrado en los enzimas provenientes de bacterias del género *Streptomyces*. Asimismo, se han estudiado posibles usos biotecnológicos de las MCL-PHA despolimerasas evaluándose para ello la actividad catalítica de estos enzimas tanto en medios acuosos como en medios anhidros.

Nota: Subvencionado por la Comisión Europea (Contrato 026515-2), SAIOTEK 09/NANOMAG y GIU07/55. MS es becario predoctoral del MEC.

R11-4

Specific immobilization and purification of recombinant proteins using diethylaminoethyl-functionalized magnetic nanoparticles

María de Gracia Retamosa¹, Beatriz Maestro²,
María José Rodes¹, María Luisa Ferrer³, Puerto
Morales³ y Jesús Miguel Sanz¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Elche, ²Instituto de Electroquímica. Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, ³Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid. CSIC, Madrid

The choline-binding modules (CBMs) constitute a family of polypeptides that are part of several enzymes such as the murein hydrolases from *Streptococcus pneumoniae* and that present a high affinity for choline and other tertiary and quaternary amines, as well as for supports that contain these groups, such as diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. Fusion proteins containing one of these choline-binding modules as affinity tags can be immobilized and/or purified in a single chromatographic step by means of a simple, gentle, non-covalent procedure.

With the aim of checking the performance of the CBM system on the immobilization of proteins in nanostructures, we have evaluated the binding of the C-LytA and C-LytA fusion proteins on several classes of magnetic nanoparticles. We assayed home-made and commercial magnetite nanoparticles coated with DEAE-dextran (10 nm diameter), DEAE-starch (200 nm) or DEAE-silica (750 nm). In all cases we observed a very efficient binding of the C-LytA module, either isolated or fused to the green fluorescent protein (C-LytA-GFP) or to the β -galactosidase (C-LytA- β -gal). We set up a simple purification procedure of recombinant proteins from a bacterial extract using the 200 nm particles. Proteins could be purified this way to electrophoretic homogeneity, with a yield of around 50 mg per gram of nanoparticles, and the whole procedure could be accomplished in 20 minutes without the need of centrifugation steps.

Besides the rapid purification of proteins, DEAE-containing magnetic nanoparticles may act as protein carriers to be used in a wide panoply of applications, such as the construction of enzymatic electrodes, recyclable enzymatic bioreactors, or in vivo delivery of proteins to specific tissue targets by the application of an external magnet.

R11r-5

Desarrollo de un test para la detección de contaminantes genotóxicos en alimentación humana y animal

Laura Sánchez Vicente¹, Elisa Herráez Aguilar¹, Óscar Briz Sánchez², Alba María García Blázquez³, Eduarda Molina Alcaide⁴ y José Juan García Marín³

¹Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)., Salamanca, ³Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ⁴Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

Antecedentes: El sistema SOS bacteriano activado por un daño en el material genético incluye la expresión del gen RecA.

Objetivo: Desarrollar un “biosensor” que permita detectar los niveles de contaminantes genotóxicos con interés en alimentación humana y animal.

Métodos y Resultados: Utilizando el test de MTT y células de origen hepático e intestinal se determinó la toxicidad aguda y el efecto antiproliferativo de varios contaminantes ambientales, para establecer las concentraciones tóxicas y subtóxicas a utilizar en la evaluación de su genotoxicidad en bacterias. Mediante tecnología Gateway se construyó un plásmido que contenía la ORF de la luciferasa Luc2 bajo el control del promotor de RecA, con el que se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL21 y se determinó la inducción de la actividad luciferasa tras la exposición al compuesto problema durante 2.5 h a concentraciones previamente caracterizadas como no tóxicas para *E. coli*. Como contaminante de referencia se utilizó K₂Cr₂O₇, que inducía una expresión de Luc2 proporcional a los niveles de compuesto en el medio hasta un punto (350 nM) de máxima inducción sin toxicidad. Otros compuestos como Pb(NO₃)₂, CdCl₂ y cisplatino, también activaron la expresión de Luc2. La aplicación de este test en el análisis de extractos acuosos y metanólicos de liofilizados de tomate y pepino, y cenizas de orujo y otros residuos vegetales utilizados en la alimentación del ganado reveló la ausencia de contaminantes genotóxicos en todas las

muestras salvo aquellas en las que el análisis por HPLC-MS/MS había detectado contaminación por metales pesados.

Conclusión: Se ha puesto a punto un método de detección de contaminantes genotóxicos usando como biosensor la alta capacidad de respuesta del promotor RecA al daño en el ADN bacteriano.

R11-6

Clonación y caracterización cinética de una nicotinamidasas de *Oceanobacillus iheyensis*

Guiomar Sánchez Carrón, María Inmaculada García García, Agustín Sola Carvajal, Francisco García Carmona y Alvaro Sánchez Ferrer
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - A, Universidad de Murcia, Murcia

Las nicotinamidasas son enzimas que hidrolizan nicotinamida (NAM) a ácido nicotínico. Las Nics se han descrito en micobacterias, arqueas, eubacterias, levaduras, plantas e invertebrados, pero no en mamíferos. La participación de estas enzimas en la homeostasis del NAD⁺, las hace esenciales para la viabilidad de varios patógenos humanos, y el hecho de que el genoma humano no codifique una nicotinamidasas, sugiere que moléculas inhibitoras de estas podrían utilizarse como agentes antimicrobianos. Por otro lado, algunas Nics, como la de *Mycobacterium tuberculosis* son responsables de la activación de la prodroga pirazinamida (PZA) al antibiótico ácido pirazinoico.

Este trabajo describe la clonación, sobreexpresión y caracterización de una nueva Nic de *Oceanobacillus iheyensis* (OiNic). Esta enzima dimérica muestra un pH óptimo de 8.0 y una temperatura óptima de 45 °C. La temperatura de melting de esta enzima, se encuentra en torno a 53°C, aumentando hasta 61 °C en presencia de Zn²⁺, ion metálico probablemente unido en la estructura de la proteína. OiNic es activa frente a PZA con una K_M para este pro-fármaco de 0.1 mM, 3 veces inferior a la K_M de OiNic para NAM (0.3 mM). La estructura ha sido modelada y su morfología estructural comparada con otras Nics. Además se ha realizado el estudio filogenético de su secuencia protéica.

Nota: Estudio financiado por el MEC (BIO2010-22225-C02-01) y el Programa de Ayuda a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, de la Fundación Séneca (04541/GERM/06, Plan Regional de Ciencia y Tecnología 2007-2010). G.S.C es becario predoctoral del Ministerio de Educación (FPU). M.I.G.G y A.S.C son becarios predoctorales asociados al Programa de Ayuda a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia.

R12. Genómica y Proteómica

R12-1

Proteomic characterization of the outer membrane vesicles produced by *Stenotrophomonas maltophilia*

Elias Javier Mongiardini, Mario Ferrer Navarro, Raquel Planell Cerezo, Gerard Torret, Daniel Yero, Pol Huedo, Paula Martinez, Isidre Gibert y Xavier Daura

Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

S. maltophilia is a Gram-negative bacterium that has emerged in recent years in nosocomial infection. Although not a highly virulent bacteria by itself; its ability to form biofilm and colonize the surfaces of medical devices gives the skill to occupy a niche conducive to await favorable conditions to trigger their pathogenic effects.

Many Gram-negative bacteria constitutively secrete outer membrane vesicles (OMVs) during growth. Different functions have been demonstrated for this vesicles such as delivery of toxins to host cells, transfer of proteins or genetic material between bacterial cells, cell-to-cell signaling and elimination of competing organism. Here we have demonstrated that the collection strain (ATCC13637) and three newly clinical isolates of *S. maltophilia* are able to releases OMVs to the media during in vitro growth. Due to the low amount of protein obtained; further purification steps could not be applied and a combination of SDS-PAGE and nano-LC-ESI-MS/MS was the method of choice for the analysis of the samples.

The proteomics analysis revealed about 150 to 200 proteins packaged in the OMVs. The bioinformatic prediction of subcellular location of the proteins yielded about 30-40% in membrane whether in outer or cytoplasmic, 30-40% in the cytoplasmic, 5-10% in the periplasmic space and 30-40% undetermined. Some of the identified proteins are involved in different transport systems across the membrane like one RND system. Also many proteases or peptidases have been found; most of them with putative or uncharacterized function. Most of the proteins identified could be related to virulence and pathogenicity suggesting that this approach may be instrumental for the discovery of novel factors involved in the *S. maltophilia* infection.

R12r-2

El papel de la exonucleasa citoplasmática Xrn1 en la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*

Daniel Medina¹, Mordechai Choder² y José Enrique Pérez-Ortín¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València, Burjassot, Valencia, ²Department of Molecular Microbiology, Rappaport Faculty of Medicine, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa (Israel)

En eucariontes, el mRNA es transcrito en el núcleo por la RNA polimerasa II, exportado hacia el citoplasma, traducido y finalmente degradado. De esta manera, el ciclo de vida del mRNA podría verse como un sistema lineal complejamente regulado. Un aspecto importante en la regulación de la expresión es el mantenimiento de los niveles apropiados de mRNA, como resultado de la interacción dinámica entre sus tasas de transcripción y degradación. Con el desarrollo de técnicas "ómicas", es posible obtener una alta cantidad de datos a partir de un único experimento. Por ejemplo, utilizando chips de DNA es posible evaluar los niveles de mRNA a nivel genómico, y estudiar la tasa de transcripción mediante la técnica de *Genomic Run On*, GRO [1]. Con ambos set de datos, es posible estimar de manera indirecta la estabilidad del mRNA.

Estudios recientes han relacionado la transcripción, traducción y degradación del mRNA mediante el complejo Rpb4-Rpb7, el cual acompaña al mRNA a lo largo de su ciclo, probablemente participando de la regulación de la expresión como un coordinador global [2]. Sin embargo, no es conocido cómo el sistema de regulación funciona, pero es posible que existan coordinadores específicos que comuniquen cada una sus etapas. En el presente trabajo, mediante la técnica de GRO, hemos encontrado que en mutantes *xrn1*, exonucleasa 5'-3' citoplasmática responsable de la principal ruta de degradación de mRNA, que las tasas de transcripción están reducidas de forma compensatoria al aumento de las estabildades de los propios mRNA, lo cual sugiere que la transcripción y la degradación del mRNA serían dos procesos acoplados y comunicados entre sí.

[1] *Mol. Cell* 15, 303-313.

[2] Harel-Sharvit L. *et al. Cell* 2010; 143: 552-63.

R12m-3

Nuevas estrategias para degradómica C-terminal de metalo-carboxipeptidasas: buscando sustratos naturales in vivo y ex vivo

Sebastian Tanco¹, Petra Van Damme², Silvia Bronsoms¹, Xin Zhang³, Julia Lorenzo¹, L.D. Fricker³, Kris Gevaert² y F.X. Aviles¹

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB, Cerdanyola del Vallès, ²VIB Department of Medical Protein Research, University of Gent, Gent (Belgium), ³Albert Einstein College of Medicine, New York (USA)

La búsqueda de sustratos naturales para proteasas es de suma importancia, ya que ayuda a determinar su función celular, lo que a su vez permite una mejor evaluación de la proteasa como diana terapéutica en el diseño de fármacos. Hasta hace poco las metodologías proteómicas desarrolladas eran aplicables principalmente a endoproteasas, dejando un vacío a la hora de realizar búsquedas masivas de sustratos para carboxipeptidasas, enzimas que actúan sobre el extremo C-terminal de proteínas y péptidos. Estos enzimas han sido asociados a una gran diversidad de funciones fisiológicas como son los procesos de fibrinólisis, procesamiento de hormonas y neuropéptidos, neurodegeneración, inflamación y cáncer entre otros. Dada la acuciante necesidad de estrategias que tengan en consideración las particularidades de este tipo de exopeptidasas, hemos participado en el desarrollo de técnicas proteómicas para la búsqueda de sustratos de carboxipeptidasas in vivo o ex vivo. Por un lado, la aplicación de la peptidómica permite el estudio de la especificidad de sustrato para dichos enzimas, y facilita el hallazgo de sustratos biológicamente relevantes (Tanco S. *et al.*, 2010). Por otro lado, la utilización de peptidotecas generadas por digestión proteolítica de extractos celulares provee de una gran variedad de potenciales sustratos peptídicos que pueden ser utilizados para la determinación precisa de la especificidad de estos enzimas. Complementariamente, la aplicación de la metodología del COFRADIC C-terminal (Van Damme P. *et al.*, 2010) facilita la búsqueda para dichos enzimas de sustratos proteicos in vivo en sistemas biológicos complejos.

R12-4

Caracterización cuantitativa del fosfoproteoma del linfocito T primario humano durante su activación mediante marcaje isotópico y espectrometría de masas

Montserrat Carrascal
LP-CSIC/UAB, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona

Los procesos de fosforilación-defosforilación proteica juegan un papel primordial en prácticamente todos los aspectos de la función celular. La caracterización de los componentes del fosfoproteoma y de sus perfiles de fosforilación en diferentes condiciones es, en consecuencia, de vital importancia para la comprensión de los mecanismos celulares implicados en la enfermedad y para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a modular la actividad de quinasas y fosfatasa. En este trabajo se muestran los cambios cuantitativos producidos en el fosfoproteoma de linfocitos T humanos primarios tras su activación durante 15 minutos y 2 horas con PMA/Ionomicina. Los extractos proteicos de las células en reposo y activadas se digirieron con tripsina, se marcaron con TMT y se mezclaron. La mezcla se fraccionó mediante SCX y los fosfopéptidos se enriquecieron con IMAC y TiO₂ (Carrascal *et al.* JPR. 2008). Finalmente, los extractos se analizaron por LC-MS/MS para la identificación y cuantificación de las secuencias utilizando una combinación de barridos CID y HCD en un instrumento de alta resolución (Orbitrap-LTQ). Las secuencias caracterizadas se almacenaron en la base de datos pública LymPHOS (<http://lymphos.org>). Se ha implementado un flujo de trabajo automático para su anotación que incluye herramientas para el filtrado de datos espectrométricos y para la asignación precisa del punto de fosforilación. Estos datos constituyen el único mapa de puntos de fosforilación disponible para células T humanas.

R12-5

Integration and data-mining of multidimensional oncogenomic data

Nuria Lopez-Bigas
Research Unit on Biomedical Informatics, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

The amount of cancer genomics data being generated is astonishing, however the analysis and interpretation of this data is not trivial. Typically a tumour harbours large number of genomic alterations, not all of which are involved in the tumorigenic process. Thus, one of the main

challenges in cancer genomics is to be able to distinguish between alterations driving tumorigenesis and those that are not (known as passenger alterations). In my lab we are developing approaches to integrate, analyze and visualize cancer genomics data with the objective of identifying cancer driver alterations.

We have developed *IntOGen* (<http://www.intogen.org>), a resource that integrates multidimensional OncoGenomics data for the identification of genes and groups of genes (biological modules) involved in cancer development. We have also created *Gitools* (<http://www.gitools.org>), an open source software for the analysis and visualization of genomic data using interactive heat-maps and *Condel* (<http://bg.upf.edu/condel>), an improved method for the assessment of the outcome of non-synonymous SNVs by combining the results of various independent methods.

R12-6

Role of the gene transcriptional repressor HDAC7 in B lymphocytes

Maribel Parra

Cellular Differentiation Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), IDIBELL, Hospitalet de Llobregat

The hematopoietic system constitutes one of the best models to investigate cell lineage commitment and differentiation. The central role of lineage-specific transcription factors in positively regulating the distinct differentiation processes that comprise the hematopoietic system is well established. However, increasing evidence highlight the relevance of transcription factors in silencing lineage-inappropriate genes. To date, very little is known on the role of transcriptional repressors, such as histone deacetylases (HDACs), in lineage specification and differentiation of hematopoietic cells. We have obtained promising data indicating a lineage-specific expression pattern for the histone deacetylase HDAC7 in the hematopoietic system. Specifically, HDAC7 is expressed in pre-B cells and not in macrophages. To explore the possibility that HDAC7 could act as key transcriptional repressor in B lymphopoiesis, we have investigated a pre-B cell to macrophage reprogramming system. During the cellular reprogramming thousands of genes are up- and downregulated, including many that are restricted to cells of the cell B lineage and macrophages. We have observed that HDAC7 expression is dramatically downregulated during the cellular transdifferentiation. To investigate the molecular basis for the involvement of HDAC7 during the reprogramming of B cells to macrophages, we have ectopically reintroduced HDAC7 in the pre-B cell inducible system and performed microarray experiments. With this approach we will determine first, the HDAC7 repressed

genes in B cells and second, its potential capacity to interfere, at least in part, in the B cell to macrophage reprogramming process. Our strategy will provide valuable insights on the potential role of HDAC7 in maintaining B cell identity.

R13. Metabolismo del Nitrógeno

R13-1

Distribución espacial de comunidades bacterianas asociadas al ciclo del nitrógeno en sedimentos de un humedal artificial en el Parque Nacional Doñana

David Correa¹, Diana E. Marco², Germán Tortosa¹ y Eulogio J. Bedmar¹

¹*Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada,*

²*Laboratorio de Ecología Matemática, Area de Producción Orgánica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Córdoba (Argentina)*

La distribución espacial de las poblaciones de microorganismos asociados a los procesos de nitrificación y desnitrificación del humedal de los Guayules (Parque Nacional de Doñana) se ha determinado mediante cuantificación por qPCR de los genes *amoA* de bacterias y arqueas, como marcador de la nitrificación, *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*, como marcadores de la desnitrificación, y el gen 16S rRNA como indicador de la población de los dominios Bacteria y Archaea. En cada uno de los 50 puntos analizados, además, se han caracterizado las propiedades biogeoquímicas y la actividad desnitrificante de los sedimentos. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el cálculo de la varianza geostatística, que también se empleó para correlacionarlos entre sí. Además de complejas, las distribuciones espaciales de las comunidades de bacterias y arqueas fueron diferentes entre sí. La distribución de cada uno de los genes estudiados presentó patrones con distintos grados de autocorrelación, aunque en general confinados a distancias de unos 10 m. De forma similar, la actividad desnitrificante mostró autocorrelación en escalas comparables a las de los genes. Por el contrario, las propiedades biogeoquímicas de los sedimentos mostraron distribuciones espaciales más diversas. La distribución espacial de las comunidades microbianas y de sus actividades funcionales mostró una relación compleja con las propiedades biogeoquímicas y las

variables ambientales.

Nota: Este trabajo se ha subvencionado con fondos cofinanciados por FEDER del proyecto RNM4746 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de Junta de Andalucía (España). D. E. Marco agradece al MEC la ayuda para estancia sabática en la EEZ-CSIC.

R13-2

Producción de óxidos de nitrógeno gaseosos en *Thermus thermophilus*

Carlos Bricio¹, Laura Álvarez¹, Robert Gennis² y José Berenguer¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, ²University of Illinois, Urbana, IL (USA)

Varias cepas de *Thermus thermophilus* son capaces de respirar en anaerobiosis mediante un proceso de desnitrificación parcial o aparentemente completa con la consecuente acumulación de óxidos de nitrógeno en forma gaseosa. El primer paso de este proceso es la reducción de nitrato a nitrito y es catalizado por una nitrato reductasa codificada en un elemento conjugativo (NCE) [1] que incluye transportadores de nitrato/nitrito, reguladores transcripcionales y señalizadores encargados de regular el cambio al metabolismo anaerobio en presencia de nitrato. En los siguientes pasos del proceso el nitrito es reducido a óxido nítrico y este a su vez a óxido nitroso, catalizados por una nitrito reductasa de tipo cdI y una óxido nítrico reductasa, respectivamente. Estos enzimas han sido localizados en una región variable del megaplásmido de *T. thermophilus* (pTT27) que puede ser transferida lateralmente mediante transformación o conjugación a cepas aerobias [2]. Sorprendentemente, en el genoma de la cepa desnitrificantes tipo PRQ25, no se han encontrado homólogos al enzima óxido nitroso reductasa, encargado de catalizar el paso del óxido nitroso a nitrógeno gas como producto final de la desnitrificación. Para determinar si *T. thermophilus* es capaz de desnitrificar completamente se ha estudiado la producción de óxido nítrico y óxido nitroso en diferentes cepas desnitrificantes. Por otro lado se ha analizado la inducibilidad por diferentes óxidos de nitrógeno de los genes que codifican los enzimas implicados en la desnitrificación.

Además, se está intentando purificar el enzima óxido nítrico reductasa para realizar un estudio bioquímico del mismo.

[1] Cava *et al.* *Mol Microbiol* 2007.

[2] Álvarez *et al.* *Appl Environ Microbiol* 2011.

R13-3

Caracterización de un péptido antimicrobiano relacionado con la absorción de amonio en las raíces del pino marítimo

Javier Canales Carrasco, Concepción Ávila Sáez y Francisco M. Cánovas Ramos

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga

Los péptidos antimicrobianos (AMP) forman una gran familia de proteínas pequeñas, ricas en cisteínas, que están implicadas en la defensa de las plantas frente al ataque de los patógenos. Recientemente se ha descubierto que los péptidos antimicrobianos pueden tener también un papel relevante en el desarrollo y la reproducción de las plantas. En un trabajo previo hemos identificado un gen que codifica para un AMP de la familia beta barrelinas, el cual se regula de manera diferencial en respuesta a la disponibilidad de amonio en las raíces del pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) [1]. En esta comunicación presentamos la caracterización molecular de dos genes de esta familia de AMP, *PpAMP1* y *PpAMP2*, que tienen propiedades físico-químicas diferentes. Estos dos genes también mostraron patrones de expresión muy diferentes, tanto en los estadios plantulares como en los adultos. Además, los estudios de expresión génica que realizamos indican que *PpAMP1* es la forma mayoritaria de esta familia de AMP en pino y que su abundancia se regula por la disponibilidad de amonio. En cambio, *PpAMP2* se expresa a niveles mucho más bajos y no se regula por amonio. Como un primer paso para averiguar la función de *PpAMP1*, sobreexpresamos la proteína recombinante en *E. coli* y demostramos que *PpAMP1* inhibe fuertemente el crecimiento de células de levadura, lo que indica que tiene actividad antimicrobiana. Además averiguamos que la proteína recombinante de *PpAMP1* altera la absorción de amonio, lo que sugiere que esta proteína puede estar implicada en la absorción de amonio en las raíces de pino.

[1] Canales J., Avila C., Canovas F.M.: A maritime pine antimicrobial peptide involved in ammonium nutrition. *Plant Cell Environ* 2011.

R13-4

***Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: un cianotrofo productor de bioplásticos**

Isabel Manso Cobos¹, Lara Paloma Sáez Melero¹, M^a Isabel Ibáñez García¹, Fernando de la Peña Moreno², Victor Manuel Luque Almagro¹, Manuel Martínez Luque¹, Francisco Castillo Rodríguez¹, Jose Luis García López³, María Dolores Roldán Ruiz¹, María Auxiliadora Prieto Jiménez³ y Conrado Moreno Vivían¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, Universidad de Córdoba, Córdoba, ²Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, ³Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Madrid

El cianuro es un compuesto nitrogenado tóxico para los microorganismos dado que se une irreversiblemente a metaloproteínas inhibiendo su función. Se genera de forma natural por algunas bacterias, algas, hongos, plantas superiores y de forma antropogénica, por la industria joyera, metalúrgica y minera. A pesar de su alta toxicidad, el cianuro puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por algunos microorganismos. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 tolera y asimila altas concentraciones de cianuro (hasta 30 mM) en condiciones alcalinas (pH 9-10), lo que evita su volatilización en forma de HCN. El empleo de esta cepa en biorreactores permite la descontaminación del residuo de la industria joyera mediante la eliminación del cianuro libre y complejos cianuro-metálicos. Al mismo tiempo que la bacteria elimina el cianuro, acumula gránulos intracelulares compuestos de polihidroxialcanoatos (PHA). En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* se han identificado los genes implicados en la biosíntesis y el metabolismo de scl-PHA (monómeros de 4-5 átomos de carbono) y mcl-PHA (monómeros de 6-14 átomos de carbono). La producción de PHA se ha determinado por fluorescencia en células cultivadas con octanoato y diferentes fuentes de nitrógeno, encontrándose una producción máxima con amonio. La composición del PHA intracelular de *P. pseudoalcaligenes* se ha determinado mediante GC-MS. Así, cuando es cultivada en presencia de octanoato sódico y cloruro amónico, el PHA que acumula está compuesto por un 55,8 % de 3-hidroxiibutirato y un 40,16% de 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxi octanoato. En un futuro se pretende analizar la producción de PHA cuando la bacteria es cultivada con cianuro libre o residuos industriales cianurados y con diferentes fuentes de carbono.

R13-5

Efecto de la fotorrespiración y de la fuente nitrogenada en la transcripción de los genes de asimilación de amonio en *Lotus japonicus*

Carmen María Pérez Delgado de Torres¹, Margarita García Calderón¹, Pedro Díaz², Antonio J. Márquez Cabeza¹ y Marco Betti¹

¹Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, Sevilla,

²Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía, Montevideo (Uruguay)

La fotorrespiración es una ruta metabólica cuya función fisiológica exacta es todavía objeto de debate. En nuestro laboratorio se han obtenido mutantes de glutamina sintetasa (GS) plastídica en la leguminosa modelo *Lotus japonicus* demostrando el papel clave de esta enzima en la reasimilación del amonio fotorrespiratorio en esta planta. Estos mutantes acumulan grandes cantidades de amonio en las hojas en condiciones de fotorrespiración activa.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la fotorrespiración y de la nutrición nitrogenada sobre los genes de la asimilación de NH_4^+ de *Lotus japonicus*. En primer lugar se determinó la respuesta transcripcional de estos genes en plantas cultivadas en diferentes fuentes nitrogenadas (NO_3^- , NH_4^+ y NH_4NO_3) en atmósfera de aire.

En segundo lugar, para evaluar el efecto de la fotorrespiración, se estudió la respuesta transcripcional en plantas, cultivadas en diferentes fuentes nitrogenadas, en atmósfera enriquecida en CO_2 , condición en la cual la fotorrespiración está suprimida. Por último, se estudió el efecto de la deficiencia en GS plastídica sobre los niveles de expresión de los genes de asimilación de NH_4^+ utilizando plantas mutantes deficientes en la isoforma plastídica de GS, cultivadas en diferentes fuentes nitrogenadas y atmósfera enriquecida en CO_2 . Los datos obtenidos por PCR cuantitativa en tiempo real indicaron que la modulación de los genes de asimilación de NH_4^+ en respuesta a la fotorrespiración y a la deficiencia en GS plastídica era distinta dependiendo de la fuente nitrogenada utilizada. Asimismo, se discutirá el efecto de la nutrición mixta, ya que en esta nutrición hay una modulación distinta de estos genes.

Nota: Agradecimientos: Junta de Andalucía (proyecto P-07-CVI-3026 y grupo BIO-163).

R13-6

Proteínas PII en *Haloflex mediterranei*: modificación covalente y patrón de expresión

Laia Pedro-Roig, Monica Camacho, Anna Vegara y María José Bonete

Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Universidad de Alicante, Alicante

Las proteínas PII son reguladores del metabolismo del nitrógeno muy extendidos en *Bacteria* y *Archaea* (Leigh y Dodsworth, 2007). En el arquea halófilo extremo *H. mediterranei*, se han identificado dos genes codificantes para proteínas PII, que han sido nombradas GlnK1 y GlnK2 debido a su asociación en el genoma con transportadores de amonio Amt.

Se ha visto en muchos organismos que las proteínas PII están sujetas a modificaciones post-traduccionales que regulan su actividad. La más común de estas modificaciones es la uridililación de un residuo de tirosina presente en el *T-loop* de la estructura (Magnum *et al.*, 1973); aunque también otro tipo de modificaciones han sido identificadas, como la fosforilación de serina en PII de cianobacterias (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994). Sin embargo, no es un patrón universal, ya que existen especies en las cuales las proteínas PII parecen no sufrir dicho proceso (Ehlers *et al.* 2002).

En el presente trabajo se han utilizado, como material de partida, extractos del proteoma completo de *H. mediterranei*. Variando la fuente de nitrógeno accesible en el medio, se obtuvieron distintas muestras con el objeto de identificar la hipotética presencia de alguna modificación covalente en sus proteínas GlnK. A su vez, se intentó establecer el patrón de expresión de las mismas en función de las disponibilidades del medio.

Las muestras de proteína total fueron sometidas a electroforesis bidimensional y Western Blot con anticuerpos específicos para ambas GlnKs. Finalmente los spots identificados como GlnK fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF para asignar posibles modificaciones covalentes.

Nota: Financiación: Proyectos BIO2008-00082 y Becas FPU 2007.

R13-7

Regulación local de la fijación biológica de nitrógeno en *Medicago truncatula*: una aproximación proteómica

Erena Gil-Quintana¹, Stefanie Wienkoop² y Esther María González García¹

¹Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Pamplona,

²Department of Molecular Systems Biology, University of Vienna, Vienna (Austria)

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en nódulos de leguminosas es un proceso sensible a distintos estreses ambientales entre los que destaca la sequía. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar esta inhibición de FBN sin llegar hasta el momento a esclarecerse cuál es su mecanismo responsable. Experimentos previos llevados a cabo en leguminosas de origen templado confirman el origen local, a nivel de nódulo, de la inhibición FBN en guisante [1] y *Medicago truncatula* [2].

El objetivo de este trabajo es determinar si se produce una regulación local a nivel de todo el proteoma nodular que responde al estrés hídrico o si por el contrario existen partes del metabolismo reguladas de forma sistémica. Para ello, se crecieron durante 12 semanas plantas inoculadas de *Medicago truncatula* cv Jemalong A17 en un sistema radical separado (SRS). Una mitad del SRS se regó hasta capacidad de campo mientras que la otra fracción del SRS se sometió a 7 días de sequía. Se determinaron distintos parámetros fisiológicos y se tomaron alícuotas de nódulos para el posterior estudio proteómico. Se presentará la respuesta de las distintas proteínas identificadas, discutiéndose su regulación local o sistémica en condiciones de estrés hídrico.

[1] Marino *et al.* *Plant Physiol* 2007; 143: 1968-74.

[2] Gil-Quintana *et al.* *Acta Hort (ISHS)* 2009; 846:339-44.

Nota: Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Educación del Gobierno de Navarra (228/2008). E Gil-Quintana es beneficiaria de una beca predoctoral de la Universidad Pública de Navarra.

R13-8

Herramientas genéticas para investigar el efecto del arsénico sobre la interacción leguminosa-*Rhizobium*

Alejandro Lafuente Pérez, Eloisa Pajuelo Domínguez, Miguel Ángel Caviedes Formento y Ignacio D. Rodríguez-Llorente

Departamento de Microbiología y Parasitología. Fac. Farmacia. Universidad de Sevilla, Sevilla

El arsénico (As) afecta a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, provocando una disminución en el número de nódulos y diferencias en la expresión de genes de nodulación, en especial los expresados en la epidermis de la raíz [Pajuelo E *et al* 2008; Lafuente A *et al* 2010].

En este trabajo utilizamos diferentes herramientas moleculares para investigar el efecto del As sobre la nodulación. La hibridación de "microarrays" de *Medicago truncatula* mostró la existencia de 168 genes sobreexpresados y 167 genes inhibidos (>5 veces) en raíces inoculadas y cultivadas en presencia de As. Destaca la sobreexpresión de genes de respuesta a estrés abiótico y síntesis de glutatión y fitoquelatinas, y la inhibición de genes del metabolismo central y del proceso de nodulación. Los resultados se confirmaron por qRT-PCR.

Se utilizó el sistema *Pairwise comparison* para agrupar los genes según sus niveles de expresión en presencia de As, y se obtuvieron 10 grupos con genes de patrones de expresión similares. Genes de una misma ruta metabólica comparten patrones de expresión similares (ruta de síntesis de glutatión, transporte a vacuola de xenobióticos o nodulación).

Posteriormente, se utilizó el mutante supernodulante *summ* de *M. truncatula* para analizar el efecto del As en la nodulación, comprobando que, como el silvestre, el mutante también sufre disminución en el número de cordones de infección y en el número de nódulos (75-90%). La hipótesis que barajamos con los datos obtenidos, es que el As afecta a genes expresados en células epidérmicas de la raíz, afectando a la iniciación y progresión del cordón de infección, mientras que los procesos ocurridos en el córtex, como organogénesis, se ven menos afectados.

R13-9

Control redox de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. Implicación de RegSR

María J. Torres, Emilio Bueno, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa y María J. Delgado
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria del suelo capaz de desnitrificar tanto en vida libre como en simbiosis, siendo los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDYFLX* que codifican las enzimas nitrato-, nitrato-, óxido nítrico- y óxido nítrico-reductasa, respectivamente, necesarios para llevar a cabo dicho proceso. En *B. japonicum*, se han descrito dos cascadas reguladoras, FixLJ-FixK2y RegSR-NifA, de respuesta a oxígeno. Estudios recientes, han demostrado, que la proteína NifA es necesaria para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación en *B. japonicum*. Sin embargo, se desconoce el papel de las proteínas RegSR en dicho proceso. RegSR pertenece a la familia de sistemas sensor-regulador de dos componentes involucrados en el control de la expresión génica en respuesta a potencial redox. En este trabajo, hemos llevado a cabo un análisis de transcriptómica en la cepa mutante *regR* de *B. japonicum* cultivada bajo condiciones desnitrificantes en medio mínimo

suplementado con una fuente de carbono oxidada como succinato. Los resultados obtenidos revelan que la expresión de los genes *nor* y *nos*, entre otros, son claramente dependientes de RegR. Estos resultados han sido validados mediante PCR cuantitativa a tiempo real. La determinación de actividad β -galactosidasa de una fusión transcripcional *norC-lacZ*, así como la detección de la proteína NorC mediante tinción del grupo hemo *c*, en la cepa parental y las mutantes *regS* y *regR* cultivadas con una fuente de carbono reducida como el butirato, han demostrado la implicación tanto de RegR como de RegS en la expresión de los genes *nor*. Sin embargo, en un medio suplementado con succinato, RegS no interviene en dicho control. El mecanismo de control redox de los genes *nor* mediado por RegSR es actualmente objeto de estudio.

R13-10

Caracterización molecular Nrt1 de *Chlamydomonas reinhardtii*

Zaira González Sánchez¹, José Javier Higuera Sobrino¹, José Manuel Siverio Expósito², Emilio Fernández Reyes¹ y Aurora Galván Cejudo¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales. Edif. Severo Ochoa 14071 Córdoba, España, Córdoba, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, España, La Laguna, Tenerife

La familia de transportadores NRT1 es ubicua y está ampliamente representada en plantas. *Arabidopsis* contiene 53 genes. Son proteínas de 12 dominios transmembranas relacionadas con el transporte de nitrato, dipéptidos, tripéptidos, resistencia a cadmio, etc. NRT1.1 de *Arabidopsis* (CHL1) es un transportador dual de nitrato que funciona como transportador de alta afinidad cuando está fosforilado en T101, y de baja afinidad en su forma desfosforilada. También, AtNRT1.1 se considera un sensor de la disponibilidad de nitrógeno por lo que se ha denominado tranceptor [1]. Otro miembro de la familia NRT1 de *Arabidopsis*, NAXT1, funciona en el eflujo de nitrato [2]. En el caso del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, solo existe un gen *Nrt1* en su genoma cuya caracterización molecular y funcionalidad se ha abordado en este trabajo. Se ha amplificado su correspondiente cDNA, observándose la aparición de diferentes isoformas. Este gen se expresa en medios con amonio aunque la presencia de nitrato aumenta los niveles de transcrito.

Se ha desarrollado una estrategia antisentido para inactivar *CrNrt1* en diferentes fondos genéticos que portan un gen sensor del estado nitrogenado, *pNial-ARS*, formado por el reportero arilsulfatasa bajo control de la nitrato reductasa. Este gen sensor ha permitido estudiar el papel de NRT1 en

la señalización del estado nitrogenado así como las actividades de transporte de nitrato/nitrito. También se ha utilizado un sistema heterólogo de levadura, *Hansenula polymorpha*, para estudiar la funcionalidad de NRT1 de *Chlamydomonas* como transportador de nitrato.

[1] Ho *et al. Cell* 2009; 138: 1184-94.

[2] Segonzac *et al. Plant Cell* 2007; 19: 3760-77.

Nota: Este trabajo ha sido financiado por de la Junta de Andalucía, Proyecto PO8CVI-4157.

R13-11

Las arrestinas en la regulación del transportador de nitrato Ynt1 en levaduras

Norberto Escudero y José M. Siverio

Grupo del Metabolismo del Nitrógeno, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Tecnologías Biomédicas, Universidad de La Laguna, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife

En levaduras la ubicuitina ligasa Rsp5 cataliza la ubiquitinación de los transportadores de membrana plasmática, iniciando su internalización y degradación vacuolar. En muchos casos este proceso conlleva la interacción de los dominios WW de Rsp5 con los motivos PY de los transportadores. Sin embargo, Rsp5 responde a multitud de estímulos y ubicuitina un amplio grupo de permeasas escasamente relacionadas o carentes de motivos PY. Los mecanismos implicados en la selectividad Rsp5-diana han comenzado a comprenderse en *Saccharomyces cerevisiae*. La familia de proteínas ART (*arrestin-related trafficking adaptors*) reconoce específicamente los transportadores en respuesta a distintos estímulos y une Rsp5 mediante sus múltiples motivos PY. En la levadura *Hansenula polymorpha* hemos identificado hasta cinco genes ortólogos con los de *S. cerevisiae*. Nuestro objetivo es estudiar su efecto sobre el tráfico intracelular del transportador de nitrato de alta afinidad Ynt1. En respuesta a fuentes preferidas de nitrógeno o ayuno de carbono Ynt1 se endocita y se degrada en la vacuola. En fuentes pobres de nitrógeno el transportador se fosforila y se dirige a la membrana plasmática [1, 2, 3]. En una primera aproximación hemos delecionado los genes de las arrestinas y estamos estudiando su efecto sobre el tráfico intracelular y estabilidad de Ynt1. También planeamos estudiar su efecto sobre la ubiquitinación y fosforilación de Ynt1.

[1] Martín Y., González Y.V., Cabrera E., Rodríguez C., Siverio J.M. *JBC* 2011 (in press).

[2] Navarro F.J., Martín Y., Siverio J.M. *JBC* 2008; 283: 31208-17.

[3] Navarro F.J., Machin F., Martín Y., Siverio J.M. *JBC* 2006; 281: 13268-74.

Nota: Proyecto BFU2010-16192 MICINN. N.E. es becario FPU, Ministerio de Educación.

R13r-12

En la bacteria cianotrófica *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 la expresión del sRNA *prfF* está regulada por Fur

Gracia Becerra, Faustino Merchán, Rafael Blasco y M. Isabel Igeño

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Cáceres

En muchas bacterias, la homeostasis del hierro está controlada fundamentalmente por el regulador de la captación de hierro (Fur), un represor transcripcional. Sin embargo, algunos genes están positivamente regulados por Fur. En *Escherichia coli* la transcripción del pequeño RNA (sRNA) RhyB está directamente reprimida por Fur, y se ha demostrado que la regulación positiva que Fur ejerce sobre determinados genes es el resultado de la represión de otras entidades reguladoras negativas. En *Pseudomonas aeruginosa* se han identificado los sRNA homólogos a RhyB, PrrF1 y PrrF2 que muestran entre sí una identidad del 95 %. Todas las *Pseudomonas* secuenciadas hasta el momento contienen dos copias de *prfF*, situadas en regiones alejadas en el genoma, con la excepción de *P. aeruginosa* en la que ambas copias se encuentran localizadas en tándem. El análisis de la secuencia del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 indica que, al contrario de lo que ocurre en otras *Pseudomonas*, solo existe una secuencia génica que presente homología significativa con *prfF1* y *prfF2*, a la que hemos denominado *prfF*. En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la expresión de *prfF* se induce en condiciones de hierro limitante. Además la estirpe mutante en *fur* presenta una sobreexpresión constitutiva de *prfF*. Estos datos indican que, al igual que ocurre en otras bacterias, en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la expresión del sRNA PrrF está regulada por la proteína Fur.

Nota: Los autores agradecen la financiación de este trabajo por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-04542-C02-02), Junta de Extremadura (PRI07A097 y Ayuda a Grupos-BioMic) y FEDER 2007-2013. G. Becerra agradece la beca concedida por la Junta de Extremadura. Los autores agradecen la ayuda técnica de G. Gutiérrez.

R14. Neuroquímica

R14-1

La función de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer

Jesús Ávila de Grado

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
(CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

La proteína asociada a los microtúbulos, tau, está relacionada con varios aspectos patológicos de la enfermedad de Alzheimer. En esta presentación se comentará, utilizando varios modelos de ratones transgénicos, que tau fosforilado por la proteína primaria GSK3 puede ser tóxico y puede promover la neurodegeneración en el giro dentado. Este proceso neurodegenerativo da lugar a la pérdida de memoria del ratón afectado. Se comentará si un proceso similar puede llevarse a cabo en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer, que padecen como característica notoria la pérdida de memoria.

R14-2

The human p53 Arg72Pro polymorphism regulates neuronal apoptosis and modulates functional prognosis after stroke

María Delgado-Esteban¹, José Carlos Gómez-Sánchez² y Ángeles Almeida³

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, ²Servicio de Neurología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca,

³Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca

Stroke is the leading neurologic cause of death and severe long-term disability in developed countries, although functional outcome after stroke is still largely unpredictable. The presence of apoptotic neurons in the ischemic penumbra and perihematoma area may account for poor prognosis, but whether the highly variable stroke outcome reflects differences in genetic susceptibility to apoptosis is elusive. The p53 suppressor protein, an important transcriptional regulator of apoptosis, naturally occurs in humans in two variants with single nucleotide polymorphisms (SNP) resulting in *Arg* or *Pro* at residue 72. The *Arg72Pro* SNP occurs in a proline-rich domain involved in the pro-apoptotic function of p53. Thus, the *Arg72* variant of p53 is a more potent inducer of apoptosis and inhibitor of oncogenic transformation than the *Pro72*

one. Here, we aimed to investigate, using two independent hospital-based prospective cohorts of patients, whether the *Arg72Pro* SNP explains the differential functional outcome of individuals after stroke. We found that poor functional outcome after either ischemic or hemorrhagic stroke was linked to the *Arg/Arg* genotype. This genotype was also associated with early neurological deterioration in ischemic stroke, and with increased residual cavity volume in intracerebral hemorrhage. In primary cultured neurons, *Arg72-p53* but not *Pro72-p53* interacted directly with mitochondrial Bcl-xL and activated the intrinsic apoptotic pathway, increasing vulnerability to ischemia-induced apoptotic cell death. These results suggest that the *p53 Arg/Arg* genotype governs neuronal vulnerability to apoptosis and can be considered as a genetic marker predicting poor functional outcome after stroke.

R14-3

Synaptic dysfunctions and activity-dependent neurodegeneration in mice lacking cystein string protein-alpha

J.L. Rozas¹, L. Gómez-Sánchez², P. Linares-Clemente², E. Vázquez³, R.I. Luján⁴ y R. Fernández-Chacón²

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), HU Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla y Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, CIBERNED, Sevilla, ²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), HU Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla y Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, CIBERNED, Sevilla, ³Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela,

⁴Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina y Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete

Cystein string protein-alpha (CSP- α) is a synaptic vesicle protein that prevents presynaptic neurodegeneration. CSP- α KO mice suffer from a lethal neurological phenotype after the second postnatal week. At the neuromuscular junction, synaptic exocytosis is decreased in CSP- α KO mice at P16-20. Nerve terminals fail to sustain prolonged release. At these synapses, the SNARE protein SNAP25, is dramatically decreased and could be causing the lower number of transmitter release sites observed in the mutant. In addition, to monitor synaptic exo- and endocytosis we have generated transgenic mice that express synaptopHluorin (SpH) but lack CSP- α . Combining imaging and electrophysiology, we have uncovered a reduction in the size of the recycling synaptic vesicle pool

in mutant synapses. Dynamin-dependent recycling taking place during the stimulus is particularly reduced. Our results reveal that CSP- α function on the synaptic vesicle is broader than initially envisioned and being required for the long term maintenance of synaptic exo- and endocytosis.

Note: Support: MICINN BFU2007-66008, P07-CVI-02854, ISCIII, FEDER.

R14-4

Axonal locus of induction of t-LTD demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist

Antonio Rodríguez-Moreno

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, y Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, (UK)

N-methyl-D-aspartate receptors (NRs) are important for synaptic plasticity, including long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). In order to help investigate the precise location of the NRs that are required for different types of synaptic plasticity, we synthesized a caged form of the use-dependent NR antagonist, MK801, which we loaded into individual neurons *in vitro*, followed by compartment-specific uncaging. We used this method to investigate timing-dependent plasticity at layer 4-layer 2/3 synapses of mouse barrel cortex using whole-cell patch-clamp recordings. Somatodendritic photorelease of MK801 in the postsynaptic neuron produced a use-dependent block of synaptic NRs currents ($3 \pm 3\%$ of baseline amplitude, $n = 6$) and blocked the induction of t-LTP induced by 100 pairings of an EPSP followed by a single postsynaptic spike ($96 \pm 6\%$, $n = 6$). To investigate whether the axonal or somatodendritic location of NRs that are required for t-LTD we used paired whole-cell recordings of synaptically-connected L4 and L2/3 cells. t-LTD was induced by 100 pairings of a single postsynaptic spike followed by an EPSP. A UV flash confined to the somatodendritic region of the L4 neuron delivered before the start of the pairing protocol did not affect the induction of t-LTD ($80 \pm 5\%$, $n = 6$). In contrast, when the UV flash was delivered to the axonal region of the L4 cell (i.e. in L2/3) one minute before the t-LTD induction protocol, t-LTD was completely blocked ($97 \pm 4\%$, $n = 6$). Thus, compartment-specific photorelease of MK801 in the presynaptic neuron showed that axonal, but not somatodendritic, presynaptic NRs are required for induction of t-LTD.

R14-5

Caracterización del exoenzima NPP2/ATX de líquido cefalorraquídeo

Carmen R. Rodríguez¹, Agustín Castañeyra² y Pedro Rotllán¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidad de La Laguna, La Laguna, ²Departamento de Anatomía, Universidad de La Laguna, La Laguna

NPP1 y NPP2 son proteínas de la familia E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) y se ha sugerido su implicación en la hidrólisis *in vivo* de diadenosina polifosfatos (ApnA). NPP1 es un ectoenzima de membranas neurales que hidroliza ATP y ApnA modulando la señalización purinérgica mediada por estos nucleótidos. NPP2 es un exoenzima del líquido cefalorraquídeo (LCR) idéntico a autotaxina (ATX), un factor estimulante de la motilidad de células tumorales con actividad lisofosfolipasa-D. No se ha analizado la enzimología ni la función de NPP2 del LCR. El análisis de LCR por SDS-PAGE/western-blotting con anti-autotaxina detecta una banda de 120 kDa. LCR hidroliza los sustratos TMPpnp (K_m 5 mM), pNppp (13 mM) y bis-pNpp a pH óptimo 8-9. LCR hidroliza FS-3, análogo fluorogénico de lisofosfolípidos, pero no ϵ -(ApnA), análogos fluorogénicos de ApnA. La actividad enzimática es fuertemente activada por Co^{2+} y apenas por Ca^{2+} y Mg^{2+} , y es fuertemente inhibida por esfingosina 1-fosfato (S1P) y ácido lisofosfatídico (LPA), IC_{50} 0.6 y 0.02 μ M, respectivamente. La inhibición por histidina (IC_{50} 2 mM) es revertida por Zn^{2+} 0.5 mM. No se observa inhibición por ApnA ni por heparina. Ensayos enzimáticos *in gel* con TMPpnp, pNppp, bis-pNpp y FS-3 señalan picos únicos de actividad, superponibles, y muy sensibles a inhibición por S1P y LPA. Es muy llamativo que NPP2/autotaxina, a diferencia de NPP1, no hidrolice ϵ -(ApnA) ni sea inhibida por heparina. Los resultados indican que LCR tiene actividad nucleótido fosfodiesterasa debida a NPP2/autotaxina y una muy baja/ausente actividad nucleótido pirofosfatasa, descartando la función atribuida al exoenzima en el control de la señalización purinérgica mediada por ApnA.

R14r-6

FGFR1-5-HT1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity

Dasiel Oscar Borroto Escuela¹, Wilber Romero Fernández¹, Mileidys Pérez-Alea², Francisco Ciruela³, Alexander O. Tarakanov⁴, Luigi F. Agnati⁵, Natale Belluardo⁶ y Kjell Fuxe¹

¹Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), ²Aston University YUMAX, Birmingham (UK), ³Universitat de Barcelona, Barcelona, ⁴Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg (Russia), ⁵IRCCS Lido Venice, Venice (Italy), ⁶University of Palermo, Palermo (Italy)

There is no detailed understanding of the mechanism by which the hippocampal 5-HT transmission contributes to the antidepressant effects of 5-HT uptake blockers. Using BRET analysis, FGFR1-5-HT1A receptor complexes have been demonstrated and their specificity and agonist modulation characterized. The receptor interface involves TM-V and TM-VII and putative helix-8 of the 5-HT1A receptor. Their presence based on coimmunoprecipitation and PLA methods has also been indicated. In vitro assays on ERK1/2 phosphorylation have shown synergistic increases in signaling upon coactivation with FGF-2 and a 5-HT1A agonist which are specific and dependent on the FGFR1-5-HT1A receptor interface. In vivo studies also revealed a 5-HT1A agonist induced phosphorylation of FGFR1 and ERK1/2 in rat hippocampus without changing FGF-2 levels. Coactivation of the FGFR1-5-HT1A heteroreceptor also resulted in synergistic increases in neurite densities and protrusions in hippocampal cultures. The findings indicate that neurotrophic effects of 5-HT in brain may in part be mediated by activation of the 5-HT1A receptor protomer in the hippocampal FGFR1-5-HT1A receptor complex enhancing the FGFR1 signaling.

R14r-7

Papel de la fosforilación en la endocitosis regulada del transportador de glutamato GLT1

Noemí García-Tardón, Jaime Martínez-Villarreal, Ignacio Ibáñez, Cecilio Giménez y Francisco Zafra
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM y CIBERER, Madrid

El transportador de glutamato GLT1 representa la principal vía de terminación de la neurotransmisión mediada por glutamato y, por tanto, juega un papel esencial en el control de la excitabilidad de las neuronas. Además de por otros efectores, la actividad del transportador se ve afectada por diversas quinasas y vías de señalización que afectan a su tráfico intracelular. La activación de la proteína quinasa C (PKC) mediante ésteres de forbol (como el PMA) promueve la ubiquitinación del transportador y su internalización desde la membrana plasmática en vías dependientes de clatrina. Se ha descrito que GLT1 se asocia con la proteína PKC α y es fosforilado tras el tratamiento de las células con ésteres de forbol, aunque la relación unívoca entre la fosforilación de GLT1 y su

endocitosis no ha sido probada. En este trabajo se ha estudiado el papel que desempeña la fosforilación del transportador o de la maquinaria de ubiquitinación en el proceso de endocitosis. Presentamos evidencias de que PKC fosforila a GLT1 en la serina 520 de su extremo carboxilo en respuesta al tratamiento con el éster de forbol. Sin embargo, esta fosforilación no es necesaria para que tenga lugar la ubiquitinación y posterior endocitosis del transportador. La ubiquitin ligasa Nedd4-2 parece ser la responsable de la ubiquitinación del transportador y resulta fosforilada en el proceso, pudiendo ser regulada por la quinasa.

R15. Parasitología Molecular

R15r-1

Un nuevo transportador ABC implicado en la infectividad de *Leishmania*

David León-Guerrero, Jenny Campos-Salinas, Raquel García-Hernández, Mario Delgado, José María Pérez-Victoria, Santiago Castanys, Elena González-Rey y Francisco Gamarro
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada

Hemos caracterizado un nuevo transportador perteneciente a la subfamilia de *half-transporters* ABCG de *Leishmania* (LABCG1), implicado en la translocación de fosfatidilserina (PS) hacia la cara externa de la membrana plasmática (MP) del parásito. Los estudios de localización subcelular mostraron que LABCG1 se expresa en vesículas situadas próximas al bolsillo flagelar del parásito. Para estudiar su función se obtuvo una línea que sobreexpresa una versión inactiva de la proteína (DN). Estudios de acumulación de análogos fluorescentes de cadena corta de PS mostraron que la línea DN acumuló más PS que la línea control. Igualmente, los ensayos de unión con anexina-V demuestran que estos mutantes exponen una menor cantidad de PS endógena en la superficie. Los estudios in vitro de infección en macrófagos peritoneales de ratón demuestran que la línea DN presenta una disminución en la infección del 40% con respecto al control. Además, se determinó tras la purificación de parásitos metacíclicos y Western blot con el anticuerpo dirigido frente a la proteína HASPB, específica de metacíclicos, que la diferencia en la infectividad no se debe a una disminución de la diferenciación del parásito. Los estudios de infección en un modelo murino de leishmaniasis cutánea, mostraron que los

animales infectados con la línea DN presentan una significativa disminución en el tamaño de la lesión e inflamación, esta diferencia se correlacionó con una menor tasa de parasitemia. Los resultados indican que el transportador LABC1 está implicado en el desarrollo de la patología en el modelo experimental in vivo de leishmaniasis cutánea.

Nota: Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto SAF2009-07440 (F.G).

R15-2

Establecimiento del papel de la síntesis endógena de esteroides en la proliferación y morfología de *Trypanosoma brucei*

Guíomar Pérez-Moreno¹, Carlos Rodríguez-Poveda¹, Marco Sealey-Cardona¹, Michael H. Gelb², Luis Miguel Ruiz-Pérez¹, Víctor Castillo-Acosta¹, Julio A. Urbina³ y Dolores González-Pacanowska¹

¹*Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada,* ²*Departments of Chemistry and Biochemistry, University of Washington, Seattle (USA),* ³*Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Bioquímica y Biofísica, Caracas (Venezuela).*

La biosíntesis de esteroides es una ruta prometedora para el desarrollo de compuestos antiprotosomarios e inhibidores de esta ruta están en fase de desarrollo clínico para el tratamiento de enfermedades producidas por tripanosomátidos. En el caso de *Trypanosoma brucei*, los requerimientos de esteroides son muy diferentes en las distintas formas de vida del parásito aunque el papel de intermediarios específicos de la ruta en distintos procesos celulares como la endocitosis o el ciclo celular no ha sido estudiado en detalle. En este trabajo hemos explorado mediante RNAi el papel de la biosíntesis de esteroides en la endocitosis/exocitosis, el ciclo celular y la morfología en las distintas formas de vida del parásito. Los resultados muestran que la formación de escualeno y epóxido de escualeno es un proceso esencial en la forma procíclica (forma del insecto vector) y alteraciones en la síntesis de estos intermediarios producen una disminución de la tasa de proliferación junto con defectos en el tamaño celular y el potencial de membrana mitocondrial, y la aparición de formas con morfología alterada. En el caso de las formas sanguíneas (presentes en el huésped vertebrado), dónde la síntesis endógena es poco significativa y el parásito presenta colesterol procedente del huésped como esteroide mayoritario, la inhibición mediada por RNAi de la

escualeno epoxidasa da lugar a alteraciones en la citocinesis con la aparición de células polinucleadas que presentan una apariencia aberrante. Estas observaciones muestran que ambas formas de vida precisan de una composición determinada en esteroides endógenos para funciones esenciales relacionada con el mantenimiento de la morfología y la progresión del ciclo celular.

R15r-3

Chromatin SUMOylation promotes variant surface glycoprotein transcription in *Trypanosoma brucei*

Diana López-Farfán, Jean-Mathieu Bart, Isabel Vidal y Miguel Navarro

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada, Granada

In the mammalian host, bloodstream trypanosomes elude the immune response by periodically changing their main surface antigen, the Variant Surface Glycoprotein (VSG). The VSG gene is transcribed by RNA polymerase I (RNAPI) instead of RNAPII. We previously reported that transcription mediated by RNAPI in trypanosomes requires TbRPB7, a dissociable subunit of the RNAPII complex (Peñate, *et al.* 2009). Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis by qPCR showed that TbRPB7 associates *in vivo* with the VSG-ES, similar to TbRPA1. To investigate the role of TbRPB7 in the VSG transcription a two hybrid screening using TbRPB7 as bait was performed. This approach detected several putative interacting proteins, including a protein with a conserved E3 SUMO ligase domain (MIZ/SP-RING), named TbSIZ1. Immunofluorescence analysis suggested that TbSIZ1 and SUMOylated proteins associated with the active VSG expression site (VSG-ES) chromatin in the nucleus. Next, we determined the occupancy of SUMOylated proteins within the VSG-ES chromatin by ChIP using an anti-SUMO antibody. SUMOylated proteins were detected along the active VSG transcription unit but not in silent VSGs. SUMOylation of chromatin-associated proteins upstream of active VSG-ES promoter is highly enriched in contrast to control loci, suggesting this is a distinct feature of the active VSG-ES. Depletion of TbSIZ1 reduced the transcription of the active VSG promoter and the nuclear signal of SUMO-conjugated proteins. Taking together these data suggest SUMOylation is involved in the positive regulation of the VSG-ES transcription.

R15-4

Molecular events governing the lytic cycle in apicomplexa

Dominique Soldati-Favre, J. Santos, K. Frenal y W. Daher

Department of Microbiology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine University of Geneva, Geneva (Switzerland)

Apicomplexans lack normal appendages for locomotion such as cilia and flagella and instead the invasive stages of these parasites use gliding motility to power their migration across biological barriers, to invade host cells and to egress from infected cells. The conserved molecular machinery that generates motion, the glideosome, involves the action of signalling molecules, myosin motor complexes, regulators of actin dynamics, adhesins and proteases. The gliding associated protein GAP45 is an essential player of this machinery that recruits the motor at the pellicle. Our studies revealed that GAP45 recruit the myosin motor at the parasite pellicle. Moreover, the acylation of GAP45 and the length and rigidity of the molecule are critical for its function in maintaining the physical integrity of the pellicle. In the absence of ARP2/3, the formin homology 2 domain containing proteins, FRM1 and FRM2 orchestrate actin polymerization during host cell invasion. The distinct biochemical properties and subcellular distribution of the two FRMs highlight their non-overlapping contribution in glideosome function. Finally, recent findings on the parasite plasma membrane rhomboid protease, ROM4 and one of its substrate establishes a new concept in apicomplexan biology in which proteins involved in invasion may be concomitantly implicated in a checkpoint that signals the parasite to switch from an invasive to a replicative mode.

R15-5

Autophagy in trypanosomes and *Leishmania*

Jeremy C. Mottram¹, Roderick Williams², William Proto¹, Benjamin Cull¹ y Graham H. Coombs¹

¹Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow (UK), ²Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow (UK)

Autophagy is a catabolic process involving the degradation and recycling of a cell's own constituents, through the action of lysosomal enzymes. Analysis of the *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei* genomes reveals that these parasites contain many of the *ATG* genes demonstrated to be involved in autophagy in yeast and mammalian cells. These include the small ubiquitin-like modifiers ATG8 and ATG12

and we have used GFP-ATG8 and GFP-ATG12 fusion proteins as molecular markers for monitoring the pathway in *L. major* and *T. brucei*. In *Leishmania*, autophagosomes are most prevalent during differentiation of the multiplicative procyclic promastigotes to metacyclic promastigotes and from metacyclic promastigotes to amastigotes, suggesting an important role for autophagy in these remodelling processes. Live cell imaging experiments with GFP-ATG8 and fluorescent markers for various organelles, including glycosomes and the mitochondrion, have been used to monitor autophagosome cargo during differentiation. In addition, *Leishmania* mutants defective in autophagy have been used to investigate the importance of peptidases and autophagy in life-cycle progression in *Leishmania*. We have also generated an RNAi compatible *T. brucei* cell line expressing GFP-ATG8, which has allowed us to track the formation of autophagosomes and to investigate the function of *ATG* genes in African trypanosomes.

R16. Radicales Libres y Estrés Oxidativo

R16-1

The role of SirT1 in signaling the oxidative stress response to chromatin

Alejandro Vaquero

ICREA Researcher. Chromatin Biology Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), IDIBELL, Hospitalet de Llobregat

Detecting and efficiently responding to potentially fatal environmental changes is a major challenge for all organisms. Said changes are intimately associated to metabolic fluctuations and certain forms of stress (e.g. oxidative or genotoxic). Chromatin is a crucial response mediator of survival response signaling and is one of the two primary targets of most triggered protective measures. Over the past decade, evidence has suggested that the members from the Sir2 family, or *Sirtuins*, are major players in sensing and coordinating the responses geared to chromatin and to mitochondria. Sirtuins are involved in a wide range of human pathologies including cancer, endocrine-associated such as diabetes, and neurodegenerative diseases, among others. The seven mammalian Sirtuins (SirT1-7) exhibit great functional diversification, which has led to two different enzymatic activities (NAD⁺-dependent deacetylation and ADP-ribosylation), a myriad of substrates (histone and non-histone proteins) and a highly diverse pattern of cellular

localization. Sirtuins have adapted evolutionarily by acquiring new roles in gene expression, cell survival and metabolic regulation. Our work aims to understand the way Sirtuins signal oxidative and metabolic stress to chromatin and how this function modulates chromatin function and integrity. Here we show new evidences regarding the functional implications of SIRT1 in chromatin function in response to oxidative stress at two different levels: *a)* The effect of SIRT1 on constitutive heterochromatin integrity, and *b)* The identification and characterization of a novel SIRT1-containing complex that is formed under oxidative stress and that may be key to understand the wide variety of functions performed by SIRT1 under these conditions.

R16-2

Estrés oxidativo en modelos celulares de ataxia de Friedreich

Joaquim Ros

Grupo Bioquímica del Estrés oxidativo. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Universitat de Lleida, Lleida

La ataxia de Friedreich es una enfermedad causada por la repetición (entre 70 y 1700 veces) del triplete CAG en el primer intrón del gen de la frataxina. Frataxina es una proteína mitocondrial, altamente conservada desde bacterias a humanos, cuyo déficit conlleva un aumento de los niveles de hierro intracelulares. Se ha descrito que su función principal estaría directamente relacionada con la síntesis de centros Fe/S. También se proponen otras funciones como reguladora de la velocidad de síntesis de centros Fe/S, almacenamiento de hierro mitocondrial, o interactuando con el complejo II de la cadena de transporte electrónico. Nuestros estudios iniciales con modelos de *S. cerevisiae* indicaron que una falta de frataxina -Yfh1 en levaduras- genera una situación de estrés oxidativo que afectaba específicamente a proteínas mitocondriales que unían nucleótidos y magnesio. Además se observaban bajos niveles de actividad SOD debido a una disminución del manganeso intracelular. En mutantes condicionales de yfh1, se observa una activación temprana de genes implicados en el transporte de hierro y una inactivación de genes relacionados con el metabolismo respiratorio, dependientes de ADR1. Sin embargo, la actividad de enzimas con centros Fe/S se mantiene aun cuando los niveles de frataxina son indetectables. Actualmente, utilizando en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se observa que la deficiencia de frataxina también conduce a un cambio en el metaboloma, un mayor consumo de glucosa y una mayor acumulación de lípidos en el citosol. Por todo ello y contrariamente a la hipótesis establecida, la función de frataxina no es indispensable para el ensamblaje de centros Fe/S.

R16-3

Regulación de la proteína desacoplante UCP3 en condiciones de hipoxia

Susana Cadenas

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid

Las proteínas desacoplantes (*uncoupling proteins*, UCP) son proteínas de la membrana mitocondrial interna que pertenecen a la superfamilia de los transportadores de aniones mitocondriales. A diferencia de la UCP1, que se expresa en el tejido adiposo pardo y cuya función es la termogénesis adaptativa, la función fisiológica de la UCP2 y la UCP3 no está clara. La UCP2 es ubicua mientras que la UCP3 es específica del músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo pardo. Estas proteínas catalizan la conductancia a los protones de manera inducible en presencia de activadores como el radical superóxido y alquenos reactivos como el 4-hidroxinonenal. La activación de estas proteínas podría disminuir ligeramente el potencial de membrana, atenuando la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y protegiendo frente al daño celular inducido por las ROS. De este modo, el ligero descenso en el potencial de membrana inducido por la UCP2 y la UCP3 podría tener efectos antioxidantes. Además, las UCP han sido implicadas en la protección frente al daño por isquemia-reperusión. Nuestros estudios están encaminados a entender la regulación de la proteína UCP3 en condiciones de hipoxia, así como las vías de señalización implicadas. En este sentido, hemos estudiado la implicación de diversos factores de transcripción y del coactivador transcripcional PGC-1 α , un importante regulador del metabolismo de las ROS. Para ello hemos utilizado líneas celulares de músculo esquelético y corazón de ratón incubadas en cámaras de hipoxia, así como biopsias ventriculares de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea.

R16-4

Lipidomic analysis reveals novel mechanisms in redox homeostasis induced by dietary methionine restriction

Mariona Jové¹, Victòria Ayala¹, Omar Ramírez¹, Alba Naudí¹, Corinne Spickett², Manuel Portero-Otín¹ y Reinald Pamplona¹

¹Experimental Medicine Department, UdL-IRBLleida, Lleida, ²School of Life and Health Sciences, Aston University, Birmingham (UK)

It is known that eighty percent dietary methionine restriction (MetR) in rodents, like caloric restriction, increases life expectancy and maximum longevity. This is associated with a lower production of mitochondrial reactive oxygen species. Consequently, protein and DNA oxidative modifications are diminished, but the potential improvement over lipid redox status and the mechanisms involved are largely unknown. In this work we show that, in mice, *i)* 80% MetR induced marked changes in brain, spinal cord and liver lipidomic profiles; *ii)* at least 50% of the lipids changed by MetR were common in brain and spinal cord, but not in liver, suggesting the existence of a nervous system specific lipidomic signature of MetR; *iii)* these differential lipids include specific phospholipid species, suggesting an adaptive membrane response; sphingolipids, which are compatible with changes in ceramide signalling pathways, and the redox physiologically relevant ubiquinone 9 (with a concurrent loss of the ubiquinone 9 dependent NQO1 oxidase enzyme), and *iv)* oxidation products derived from cholesterol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were significantly decreased in brain, spinal cord and liver from MetR mice. These results demonstrate the importance of the adaptive response of membrane lipids in terms of stress resistance as major mechanistic contributors to the lowered rate of ageing in MetR mice.

R16-5

Análisis funcional de las glutaredoxinas monotióllicas de plantas mediante su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*

José Carlos Aires María, Gemma Bellí y Enrique Herrero

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

El estado redox de los grupos sulfidrilo proteicos está regulado por los sistemas tiorredoxina (TRX) y glutaredoxina (GRX). Las TRX usan NADPH como agente reductor, mientras que las GRXs emplean el glutatión y en la reacción participan residuos de cisteína del centro activo. Las GRX se dividen en dos subfamilias: ditióllicas (centro activo CPYC) y monotióllicas (CGFS). Las últimas tienen una amplia distribución en procariontes y eucariontes. Grx5 es una GRX monotióllica mitocondrial de *S. cerevisiae* que tiene de un único dominio GRX y actúa en la síntesis de centros Fe-S. También posee otro residuo de cisteína en la región C-terminal cuyo papel está en debate. Otras GRX monotióllicas tienen un dominio TRX en la región N-terminal y uno o más dominios GRX en tándem. Las plantas poseen una gran diversidad de GRX monotióllicas y

ditióllicas, encontrándose en mitocondria, cloroplasto y citosol. Hemos expresado algunas GRX monotióllicas de plantas en un mutante $\Delta grx5$ de *S. cerevisiae* usando un vector de expresión que compartimentaliza estas GRX en la matriz mitocondrial de la levadura. Mediante el estudio de su capacidad para rescatar los fenotipos del mutante hemos demostrado: 1) no existe una correlación directa entre la presencia de un segundo residuo de cisteína en posición C-terminal de la molécula GRX y la funcionalidad de esta, 2) no todos los módulos en tándem de la molécula de GRX son capaces de rescatar los defectos individuales del mutante $\Delta grx5$ y 3) no todos los procesos biológicos que requieren proteínas con centros Fe-S en *S. cerevisiae* son rescatados de manera similar por las GRX heterólogas de plantas, lo que puede apuntar a diferentes requisitos dependiendo del proceso.

R16r-6

Papel protector de la biliverdina frente al efecto tóxico de compuestos oxidantes endógenos y xenobióticos

Ester González-Sánchez¹, María José Pérez², Óscar Briz³, M^a Ángeles Serrano⁴, M^a Jesús Monte⁴ y José Juan García Marín⁴

¹Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca. Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ³Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ⁴Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca

Antecedentes: Durante la colestasis se acumulan compuestos, como el ácido desoxicólico (ADC), que pueden inducir daño oxidativo. **OBJETIVO:** Investigar el papel citoprotector del ciclo antioxidante biliverdina (BV) / bilirrubina (BR) mediado por la enzima biliverdina reductasa α (BVR α). **Métodos:** La ORF del gen BVR α se clonó en vectores apropiados para su expresión en células

humanas y oocitos de *Xenopus laevis*. Mediante mutagénesis dirigida se reprodujo la mutación c.214C>A que habíamos encontrado en pacientes con crisis de hiperbiliriverdinemia. Este cambio daba lugar a una proteína truncada como se observó en células hepáticas transfectadas. Su actividad resultó ser nula cuando se expresó en oocitos y se determinó por HPLC-MS/MS la conversión de BV en BR. Tras el tratamiento de células hepáticas con ADC o K2Cr2O7, se determinó la viabilidad celular mediante el test de MTT y la producción de ROS mediante citometría de flujo usando DCF-DA. Los estudios de expresión se realizaron por RT-PCRQ, WB e IF. **Resultados:** Se estudiaron tres líneas hepáticas con diferentes niveles basales de expresión de BVR α respecto a hígado humano (686% en HepG2 > 249% en PLC/PRF/5 > 60% en Huh-7). La expresión de BVR α no se modificó en presencia de BV, pero aumentó en respuesta al ADC. El tratamiento con concentraciones crecientes de K2Cr2O7 o ADC aumentó la producción de ROS y la muerte celular. Ambos efectos se prevenían, en parte, por la administración de BV de forma proporcional a su concentración en el medio de cultivo. **Conclusión:** El ciclo BV/BR puede jugar un papel protector en situaciones de estrés oxidativo, en las que además se induce la expresión de BVR α . La presencia de mutaciones inactivantes, como c.214C>A, anularían esta capacidad en los tejidos de sujetos portadores homocigóticos.

R16-7

Cambios metabólicos en el mutante condicional de frataxina en levadura

Armando Moreno-Cermeño, Èlia Obis, Joaquim Ros y Jordi Tamarit

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

La ataxia de Friedreich es una enfermedad causada por una deficiencia de frataxina, una proteína mitocondrial. En un trabajo previo se analizaron los efectos primarios de la falta del ortólogo de frataxina en levadura (YFH1), empleando para ello un mutante condicional en el que la expresión de YFH1 puede ser interrumpida mediante doxiciclina (Moreno-Cermeño et al., 2010). En dicho estudio se observó que la inactivación de la enzima con centro Fe-S aconitasa ocurría posteriormente a la activación del regulón de hierro. También se encontró que existía una disminución del consumo de oxígeno, lo cual sería una consecuencia de un fallo en la capacidad respiratoria de estas células. En el presente trabajo se realizó un análisis transcriptómico de este mutante con el fin de buscar qué rutas metabólicas adicionales se encontraban afectadas por la deficiencia de YFH1. Para ello, se analizó la expresión global de genes en células tratadas con doxiciclina durante 4 y 10 horas. Cerca

de 150 genes presentaron un cambio importante en sus niveles de expresión durante la depleción de YFH1. Entre el grupo de genes inducidos se encontraron genes relacionados con procesos como: adquisición de hierro, metabolismo de ácidos grasos, catabolismo de glucosa y respuesta a estrés. Así mismo, de los genes encontrados como reprimidos, se observó un número importante de genes que son reprimidos por glucosa. Además, estos genes fueron confirmados por un análisis proteómico. La mayoría de estos genes responden al factor de transcripción ADR1. Estos resultados indican que las levaduras deficientes en Yfh1 experimentan un rearrreglo metabólico que podría ser la explicación del fallo respiratorio observado en este mutante. Dichos cambios podrían ser promovidos por ADR1.

R16-8

Análisis in vivo de la implicación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en la reparación del DNA en *Escherichia coli*

Elaine Ferreira, Josefa Badía, Juan Aguilar, Laura Baldomà y Rosa Giménez

Universitat de Barcelona, Sant Adrià de Besòs

GAPDH es una proteína multifuncional. Además de su función en la glicólisis presenta otras actividades alternativas. En humanos participa en reparación del DNA. En este caso GAPDH interacciona y modula la actividad de la nucleasa APE1 implicada en la reparación de centros abásicos (AP) generados en células tratadas con bleomicina (BM) o agentes alquilantes. En *E. coli*, nuestro grupo identificó la interacción de GAPDH con fosfoglicolato fosfatasa, enzima que defosforila el 2-fosfoglicolato generado en la reparación del DNA dañado por BM. Dicha interacción incrementa en células tratadas con BM, lo que relaciona GAPDH con reparación de DNA en *E. coli*.

La implicación de GAPDH en la reparación del DNA se ha estudiado en bacterias silenciadas mediante la expresión de RNA antisentido. Ensayos de Western-blot permitieron evaluar un nivel de silenciamiento de GAPDH del 90%. Cultivos de estas células fueron tratados con BM, metilmetanosulfonato (MMS) o H₂O₂ a distintos tiempos. Se determinó la actividad GAPDH tanto en células silenciadas como en células tipo salvaje y la viabilidad celular por recuento de CFUs en placa. El tratamiento con BM o MMS no comportó cambios en la actividad de GAPDH, sin embargo el H₂O₂ provocó su inactivación por oxidación de la Cys catalítica. En células silenciadas la BM y el MMS producen una reducción significativa en la viabilidad celular

comparado con la respuesta de células tipo salvaje. En cambio, no se observaron diferencias en la viabilidad entre ambas cepas al tratamiento con H_2O_2 . La cuantificación de centros AP en el DNA del mutante *knockout gapA* confirma la implicación funcional de GAPDH en su reparación. En el mutante *gapA* el número de centros AP espontáneos es 1,5 veces superior al de la cepa salvaje.

R16-9

Relación entre estrés oxidativo y apoptosis inducida por esculetina en células de leucemia promielocítica aguda humana NB4: efectos mitocondriales

Virginia Rubio, Daniel Morales, Irene Gañán-Gómez, Elia Moreno-Cubero, Ana Isabel García-Pérez, M^a Cristina Tejedor y José Carlos Díez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid

Alteraciones en el balance redox pueden producir daño oxidativo con pérdida de la viabilidad celular e inducción de muerte celular. Las células NB4 provenientes de leucemia humana promielocítica aguda (APL) parecen poseer altos niveles de ROS en comparación con otros tipos de leucemia. La esculetina (6,7-dihidroxicumarina) es una cumarina que tiene actividad antitumoral contra diferentes clases de células tumorales habiéndose demostrado también que posee propiedades antioxidantes.

La esculetina induce apoptosis en células NB4 con activación de caspasa 3 y 9 y cambios en el ratio Bcl2/Bax. Se ha estudiado la correlación entre las alteraciones del equilibrio redox producidas por este compuesto antioxidante en células NB4 con la inducción de apoptosis. En tratamientos de células NB4 con esculetina 0,1 mM a diferentes tiempos (de 0,25 a 24 horas) se observó a tiempos cortos una clara reducción de los niveles de peróxidos y un mantenimiento de los niveles de superóxido mediante citometría de flujo (detectados con las sondas específicas H_2DCFDA y DHE, respectivamente). A partir de 19 o más horas de tratamiento la esculetina produce un estado oxidativo con aumento de superóxido y descenso del glutatión reducido. A partir de 6 horas se observó una reducción significativa del potencial de membrana, detectándose la salida del citocromo c de la mitocondria.

Estos resultados apoyan la hipótesis de un proceso apoptótico vía intrínseca inducido por esculetina por alteración del estado redox que afecta a la producción de radicales peróxido y superóxido con reducción de los niveles de glutatión reducido.

Nota: El trabajo se financió en parte con Ayudas CCG06-UAH/SAL-0672, CCG10-UAH/SAL-5966 y FIS PI060119.

R16-10

Incremento plasmático de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina en pacientes con enfermedad de Huntington

Isaac Tunez Fiñana¹, Eduardo Agüera Morales², Fernando Sánchez López², Ricardo Fernández³, Francisco Manuel Sánchez³, Félix Gascón⁴ y Inmaculada Tasset Cuevas¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, IMIBIC, Córdoba,*

²*Servicio de Neurología, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba,* ³*Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla,*

⁴*Hospital Comarcal Valle de los Pedroches, Córdoba*

La oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos está involucrada en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. El presente estudio analiza el daño oxidativo al DNA en pacientes con EH. 19 pacientes fueron seleccionados (10 mujeres y 9 hombres) y 15 sujetos sanos (tabulados por edad y sexo). El daño oxidativo al DNA (8-hidroxi-2-desoxiguanosina, 8-OHdG) fue medido en el plasma de todos los sujetos, junto con otros biomarcadores de estrés oxidativo (proteínas carboniladas, glutatión reducido (GSH) y capacidad antioxidante total). Los resultados muestran la presencia de estrés oxidativo en pacientes con EH, caracterizados por incrementos en 8-OHdG, proteínas carboniladas y productos de lipoperoxidación, acompañado por una reducción en los niveles de GSH y de la capacidad antioxidante total. En conclusión, estos resultados confirman la existencia de un intenso daño oxidativo al DNA, vinculado a un estrés oxidativo generalizado. Esto apoya la hipótesis de que el estrés oxidativo juega un relevante papel en la patogénesis de la EH, pudiendo contribuir a la inestabilidad cromosómica.

R16-11

Respuesta antiinflamatoria inducida por el precondicionamiento con Fe frente a la isquemia-reperfusión hepática, con relación a cambios en estatus del Fe hepático

Virginia Fernández Arancibia¹, Mónica Galleano Bonivardo², Luis Alberto Videla Cabrera¹, Gladys Tapia Opazo¹ y Susana Puntarulo Capriolo²

¹ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Comuna de Independencia (Chile), ²Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Capital Federal (Argentina)

La administración subcrónica de Fe (6 dosis i.p. de 50 mg/kg durante 15 días) genera estrés oxidativo moderado y transiente (EOx-MT) e induce preacondicionamiento (P) frente a la isquemia-reperfusión (IR) en hígado de rata, condición deletérea mediada por incrementos en la respuesta proinflamatoria. El PFe normaliza tanto la unión a DNA del NF-κB, factor de transcripción redox-sensible, como la expresión de haptoglobina, proteína de connotación antiinflamatoria. Este estudio evalúa cambios en la expresión de ferritina y pool de Fe lábil (LIP) hepáticos, en relación al EOx-MT inducido, y a la respuesta proinflamatoria hepática (TNF-α sérico). Ratas Sprague-Dawley macho fueron agrupadas en: 1) salino-cirugía simulada o sham (laparotomía sin isquemia); 2) salino-IR (1 hora de isquemia y 20 horas de perfusión); 3) Fe-sham; 4) Fe-IR. El PFe aumentó significativamente tanto el contenido de Ferritina como el LIP hepáticos (72 horas post-Fe), lo que puede determinar el EOx-MT inducido en el PFe (incremento de la relación proteínas oxidadas/glutatión total 24 horas postúltima dosis de Fe y normalización a 72 horas post-Fe). Considerando que el TNF-α sérico es reducido significativamente en el grupo Fe-IR (91% respecto a salino-IR), se concluye que la respuesta hepatoprotectora gatillada por Fe se relaciona con la supresión de la respuesta pro-inflamatoria inducida por la IR, efecto citoprotector que podría ser mediado por incremento en el LIP con inducción de EOx-MT y activación del NF-κB, junto a incremento en la síntesis de ferritina, proteína que secuestra al Fe limitando su disponibilidad y toxicidad asociada.

Nota: Financiado por FONDECYT 1110006.

R16-12

Mechanism of α -synuclein cleavage by the 20S proteasome. Inhibition of α -synuclein degradation by oxidation of its N-terminal methionines and reversion by methionine sulfureductase A

Beatriz Álvarez Castelao¹, Marc Goethals², Joël Vandekerckhove² y José González Castaño¹

¹Departamento de Bioquímica UAM-Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM. CIBERNED. Idipaz, Madrid, ²Department of Biochemistry and Department of Medical Protein Research (VIB09). Ghent University, Ghent (Belgium)

α -Synuclein is implicated in the pathophysiology of Parkinson's disease (PD) and is found aggregated in intracytoplasmic inclusions. α -Synuclein is degraded directly by the 20S proteasome. We have found that α -Synuclein interacts with the C-terminal portion of C8 subunit of the proteasome through its N-terminal region (aa1-60). The released peptides after proteasomal digestion were separated by RP-HPLC and analyzed by MALDI-TOF MS/MS, from these data we can conclude that initial cleavages of α -synuclein occur within the N-terminal region of the α -synuclein molecule. Aggregated α -synucleins wild type and its missense mutants (A30P, E46K and A53T) showed a reduced rate of degradation by the proteasome when compared with native α -synucleins. This inhibition was likely due to Met oxidation of the monomeric α -synuclein still present in the aggregated α -synuclein preparations. These results suggest that oxidation of native α -synuclein should result in the inhibition of its degradation by the proteasome. In fact, oxidation of α -synuclein with H₂O₂ produced the inhibition of its degradation by the 20S proteasome. The inhibition was mainly due to oxidation of Met 1 and 5 at the N-terminal region of α -synuclein and could be reversed by treatment of oxidized α -synuclein with methionine sulfureductase A. In conclusion, the Met RedOx control of α -synuclein cleavage by the proteasome illustrates that protein oxidation does not necessarily mean facilitated degradation by the proteasome, and opens a new way to understand proteostasis in the cell under physiological, including aging, and pathological conditions allowing further understanding of the pathology of PD and other synucleinopathies.

R17. Estructura y Función de las Proteínas

R17-1

Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog

Theodoros Goulas, Joan L. Arolas y F. Xavier Gomis-Rüth

Department of Structural Biology, Molecular Biology Institute of Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona Science Park, Barcelona

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is the most frequent disease causing anaerobe in the intestinal tract of humans

and livestock and its specific virulence factor is fragilysin, also known as *B. fragilis* toxin. This is a 21-kDa zinc-dependent metalloproteinase existing in three closely related isoforms that hydrolyze E-cadherin and contribute to secretory diarrhea, and possibly to inflammatory bowel disease and colorectal cancer. Here we studied the function and zymogenic structure of fragilysin-3 and found that its activity is repressed by a <170-residue prodomain, which is the largest hitherto structurally characterized for a metalloproteinase. This prodomain plays a role in both the latency and folding stability of the catalytic domain and it has no significant sequence similarity to any known protein. The prodomain adopts a novel fold and inhibits the protease domain via an aspartate-switch mechanism. The catalytic fragilysin-3 moiety is active against several protein substrates and its structure reveals a new family prototype within the metzincin clan of metalloproteinases. It shows high structural similarity despite negligible sequence identity to adamalysins/ADAMs, which have only been described in eukaryotes. Because no similar protein has been found outside enterotoxigenic *B. fragilis*, our findings support that fragilysins derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog that was co-opted by *B. fragilis* through a rare case of horizontal gene transfer from a eukaryotic cell to a bacterial cell. Subsequently, this co-opted peptidase was provided with a unique chaperone and latency maintainer in the time course of evolution to render a robust and dedicated toxin to compromise the intestinal epithelium of mammalian hosts.

R17m-2

The bacteriophage T4 long tail fiber needle-shaped receptor-binding tip has a trimeric intertwined iron-binding fold

Sergio Galán Bartual¹, Jose Otero Casas², Carmela García Doval³, Antonio Llamas Saiz⁴, Richard Kahn⁵, Gavin C. Fox⁶ y Mark Johan van Raaij³

¹Instituto de Química Física Rocasolano, Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Madrid, ²Faculty of Science, Leiden Institute of Chemistry, Bio-organic Synthesis, Leiden (The Netherlands), ³Centro Nacional De Biotecnología (CSIC), Madrid, ⁴Unidad de Rayos X, Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico, Campus Vida, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, ⁵Laboratoire de Proteines Membranaires, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble (France), ⁶Synchrotron Soleil, Ormes des Merisiers, Saint Aubin (France)

Bacteriophages are the most numerous organisms in the biosphere. In spite of their biological significance and the spectrum of potential applications, little high-resolution structural detail is available on their receptor-binding fibers. Here we present the pathway from production of recombinant protein to the crystal structure of the receptor-binding tip of the bacteriophage T4 long tail fiber, which is highly homologous to the tip of the bacteriophage lambda side tail fibers. It reveals an unusual elongated six-stranded anti-parallel beta-strand needle domain containing seven iron ions coordinated by histidine residues arranged co-linearly along the core of the biological unit. At the end of the tip the three chains intertwine forming a broader head domain, which contains the putative receptor interaction site. The structure reveals a previously unknown beta-structured fibrous fold, explains the remarkable stability of the fiber and provides a framework for mutations to expand or modulate receptor-binding specificity.

R17m-3

Structural basis of DNA recognition by the human mitochondrial termination factor mTERF

Maria Solà Vilarrubias

Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Barcelona

Mitochondria, the power plants that supply ATP to the eukaryotic cell, contain a genome, the mtDNA, which encodes 13 of the roughly 80 subunits involved in the oxidative phosphorylation. mtDNA transactions are regulated by proteins imported from the cytosol, among them mTERF, which is a transcription termination factor also involved in replication pausing. Previous studies showed that mTERF binds to several sites of the mtDNA with different affinities, in particular to a 28 base pairs sequence from the tRNA^{Leu}(UUR) gene. We set out to characterise the binding of mTERF to a dsDNA oligonucleotide encompassing this sequence, employing different techniques including X-ray crystallography, small angle X-ray scattering and biochemistry. The results obtained will be discussed.

R17-4

Structural basis for substrate-induced permeation by an amino acid antiporter

José Luis Vázquez-Ibar

ICREA and Institute for Research in Biomedicine (IRB-Barcelona), Barcelona

Transporters of the amino acid, polyamine and organocation (APC) superfamily play essential roles in cell redox balance, cancer and aminoacidurias. The bacterial L-arginine/agmatine antiporter, AdiC, is the main APC structural paradigm which shares the “5+5 inverted repeat” fold found in other families like the Na⁺-coupled neurotransmitter transporters. The present crystal structures of AdiC capture two states of its transport cycle: the open-to-out apo and the outward-facing Arg⁺-bound occluded. However, the role of Arg⁺ during the transition between these two states remains unknown. We have solved the crystal structure at 3.0 Å resolution of an Arg⁺-bound AdiC mutant (N101A) in the open-to-out conformation; an intermediate state between the previous known conformations. The Arg⁺-guanidinium group in the current structure presents high mobility and delocalization, hampering substrate occlusion and resulting in a low translocation rate. Further analysis indicate that the proper coordination of this group with residues Asn101 and Trp293 is required to transit to the occluded state, providing the first clues on the molecular mechanism of substrate-induced fit in a “5+5 inverted repeat” fold-transporter. The pseudo-symmetry found between repeats in AdiC, and in all fold-related transporters, restrains the rearrangements of the transmembrane helices during the transport cycle. In AdiC these movements take place away from the dimer interface, explaining the independent functioning of each subunit

R17-5

The B-A transition in DNA: a study at the single-molecule level

Silvia Hormeño¹, Borja Ibarra¹, José María Valpuesta², José L. Carrascosa², Fernando Moreno-Herrero² y J. Ricardo Arias-Gonzalez¹

¹Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia), Madrid, ²Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

We use a combination of bulk analysis and single-molecule [1] techniques to study how the local, base-stacking configuration affect the global conformational state of DNA in solution. We analyze the influence of water activity by using water-ethanol mixtures and polycationic agents [2], and the influence of sequence by using plasmid DNA which differ in G-C composition [3]. Unexpectedly, we find that a local change in base-stacking from the B- to the A-form alone does not lead to a global contraction of a single molecule. The fact that condensation coexists with the A-form base-stacking at low water activity suggests that a global rearrangement of the DNA molecule through interhelical chain associations may ultimately explain the

decrease in rise per base-pair measured by x-ray crystallography. Therefore, our results suggest a mechanism for the B-A transition in which low-humidity conditions locally change the base-stacking form and globally induce DNA condensation, an effect which may eventually stabilize a molecular contour-length reduction.

We also explore the elasticity of DNA with the aim of understanding the mechanical properties of this polymer when hydration effects are reduced. We find that DNA mechanochemical stability is reduced as ethanol concentration is increased. Binding of motor proteins to DNA locally reduces the water molecules thus decreasing the stability of the double-helix. Therefore, our results further support that the binding of proteins to DNA facilitates the mechanical processing of the strands [4].

[1] Hormeño & Arias-Gonzalez. *Biol Cell* 2006; 98: 679-95.

[2] Hormeño et al. *Biophys J* 2011; 100: 2006-15.

[3] Hormeño et al. *Biophys J* 2011; 100: 1996-2005.

[4] Hormeño, Ibarra, Valpuesta, Carrascosa and Arias-Gonzalez. Submitted 2011.

R17-6

Human mitochondrial mTERF wraps around DNA through a left-handed superhelical tandem repeat

Nereida Jiménez-Menéndez

Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Barcelona

The regulation of mitochondrial DNA (mtDNA) processes is slowly being characterized at a structural level. We present here crystal structures of human mitochondrial regulator mTERF, a transcription termination factor also implicated in replication pausing, in complex with double-stranded DNA oligonucleotides containing the tRNA^{Leu}UUR gene sequence. mTERF comprises nine left-handed helical tandem repeats that form a left-handed superhelix, the Zurdo domain.

R18. Señalización Celular

R18-1

Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls prophase centrosome separation through Nek6/7 and the mitotic kinesin Eg5

M. Teresa Bertran¹, Sara Sdelci¹, Laura Regué¹, Joseph Avruch², Carme Caelles³ y Joan Roig¹

¹Cell Signalling Research Group, Molecular Medicine Program, IRB Barcelona, Barcelona, ²Department of Molecular Biology and Medical Services, Massachusetts General Hospital and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston (USA), ³Cell Signalling Research Group, Molecular Medicine Program, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Department of Biochemistry and Molecular Biology (Pharmacy), Universitat de Barcelona, Barcelona

The NIMA-family protein kinases Nek9 and the highly similar Nek6 and Nek7 form a signaling module activated during mitosis and required for normal mitotic spindle assembly. The module upstream kinase, Nek9 (also known as Nerc1), is activated at centrosomes during prophase through a mechanism that involves phosphorylation, although the molecular details of this have remained elusive. We have identified the Polo-family kinase Plk1 as Nek9 direct activator and propose a multi-step activation mechanism for Nek9 that involves phosphorylation by CDK1 resulting in Plk1 binding to Nek9 followed by Nek9 phosphorylation and activation by Plk1. Our results provide a basis to understand the temporal and spatial pattern of Nek9 activation, integrate signaling through the NIMA-family with that of CDK1 and Plk1, and suggest new ways through which these two major mitotic kinases could control the organization and function of the mitotic machinery. In this regard we show how downstream of CDK1 and Plk1, Nek9, Nek6 and Nek7 are crucial for centrosome separation during prophase as well as how this process is controlled by Plk1 through the activation of Nek9 and ultimately the phosphorylation of the mitotic kinesin Eg5 at Ser1033, a Nek6/7 site that together with the CDK1 site Thr926 is necessary for the accumulation of Eg5 at centrosomes and subsequent centrosome separation. Failure to phosphorylate Eg5[Ser1033] results in longer prometaphases showing the importance of prophase centrosome separation for a timely mitosis.

Note: M. Teresa Bertran and Sara Sdelci contributed equally to this work.

R18r-2

Crosstalk between signal transduction and metabolism in macrophages: metabolic effects of MEK inhibition

María Pimentel Santillana, Paqui Gonzalez Través, Patricia Prieto Chinchilla, Paloma Martin Sanz y Lisardo Bosca Gomar

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid

The activation of immune cells in response to a pathogen involves a succession of signaling events leading to gene and protein expression, which requires metabolic changes to match the energy demands. Here, the metabolic profile associated with the MEK/ERK cascade in macrophages was studied and the effect of its inhibition on the specific metabolic pattern of lipopolysaccharide (LPS) stimulation was characterized. A [1,2-¹³C₂]glucose tracer-based metabolomic approach was used to examine the metabolic flux distribution in these cells. Bioinformatic tools were used to analyze changes in mass isotopomer distribution and changes in glucose and glutamine consumption and lactate production in basal and LPS-stimulated conditions in the presence and absence of the selective inhibitor of the MEK/ERK cascade, PD325901. Results showed that PD325901-mediated ERK1/2 inhibition significantly decreased glucose consumption and lactate production, but did not affect glutamine consumption. These changes were accompanied by a decrease in the glycolytic flux, consistent with the observed decrease in fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) concentration. The oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathways (PPP) and the ratio between them also decreased. However, tricarboxylic acid (TCA) cycle flux did not change significantly. LPS activation led to the opposite responses, although all these were suppressed by PD325901. However, LPS also induced a small decrease in PPP fluxes and an increase in glutamine consumption that were not affected by PD325901. We conclude that inhibition of the ERK1/2 cascade interferes with central metabolism, and this crosstalk between signal transduction and metabolism also occurs in the presence of LPS.

R18r-3

Using genetic approaches to gain insight into new functions of the Ptc1 type 2C phosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Laura Tatjer, Boris Rodríguez-Porrata, Carlos Casado, Asier González y Joaquín Ariño

Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Type 2C Ser/Thr phosphatases (PP2Cs) are a conserved group of monomeric enzymes that, in *S. cerevisiae*, are encoded by seven related genes (*PTC1-7*). Cells lacking Ptc1 display multiple phenotypes compared with other mutants of the PP2C family suggesting that Ptc1 is involved in many regulatory pathways playing specific roles that are not shared by other PP2Cs. However, besides its well-known function in the osmotic responsive pathway as Hog1 phosphatase, other cellular targets of Ptc1 remain still unknown. To gain further insight into the functional role(s) of Ptc1, and assuming that the phenotypes ascribed to the lack of Ptc1 could be caused by hyperphosphorylated substrates, we have combined the *ptc1* mutation with the entire viable kinase mutant collection and we have screened for synthetic phenotypes upon nine different stress conditions. A matrix of phenotype intensities has been created and subjected to bioinformatic analysis. Interestingly, a group of kinases whose mutation suppresses many, if not all, phenotypes of the *ptc1* mutant, belong or are related to the HOG or the cell wall integrity (CWI) pathways. This confirms and expands previous data that indicated a link between Ptc1 with these routes. The results of a screen for high-copy suppressors of the rapamycin-sensitive phenotype of cells lacking Ptc1 performed in parallel further supports a possible functional interaction between Ptc1, TOR and the CWI signaling pathways. These genetic approaches might be instrumental in shedding some light on the identification of specific target(s) for Ptc1.

R18-4

Las tres actividades de p65 α : proactivador de PI3K, modulador de PTEN e inductor de estructuras tipo-blebs

M.D. Oliver y R. Pulido

Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia

La activación de la ruta de señalización de PI3K/PTEN/AKT es frecuente en diferentes tipos de cánceres humanos. Las PI3K de clase IA son heterodímeros formados por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). La truncación oncogénica de p85 α , denominada p65 α , induce la activación constitutiva de las PI3K. Previamente, se ha descrito que p85 α , además de regular la actividad de p110, es capaz de unirse e incrementar la actividad catalítica de PTEN, regulador negativo de esta ruta. PTEN se distribuye de forma regulada entre el citoplasma y el núcleo. En el presente

trabajo, se muestra que p85 α y p65 α son capaces de retener a PTEN fuera del núcleo, lo que sugiere un nuevo mecanismo de regulación de la función de PTEN mediante estas subunidades reguladoras. Por otra parte, hemos observado la capacidad de p65 α , pero no de p85 α , de inducir formaciones esféricas en la membrana, semejantes a estructuras tipo-blebs, las cuales se han relacionado con motilidad celular. Nuestros resultados sugieren nuevas funciones para p85 α y p65 α , regulando la localización subcelular de PTEN e induciendo de forma diferencial la formación de estructuras tipo-blebs.

R18-5

Regulación por colesterol de la respuesta celular frente al estrés oxidativo mitocondrial: Implicaciones patológicas

Anna Colell

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona

A pesar del pobre contenido en colesterol de las mitocondrias nuestros estudios revelan la importancia del mismo frente al estrés oxidativo generado en la mitocondria. Por un lado, un incremento de colesterol a través de afectar el transporte mitocondrial de glutatión disminuye los niveles de su principal defensa antioxidante, sensibilizando a las células frente a estímulos apoptóticos inductores de ERO mitocondriales. En particular, observamos como el incremento de colesterol en mitocondrias de ratones transgénicos SREBP2 aumenta la susceptibilidad frente a la permeabilización mitocondrial inducida por péptidos beta-amiloideos (A β). Además, la sobreexpresión de SREBP2, inductor de la síntesis de colesterol, en modelos murinos de la Enfermedad de Alzheimer acelera las manifestaciones patológicas de la enfermedad. El incrementado estrés oxidativo que se observa en los ratones APP/PS1/SREBP2 promueve la activación de diferentes quinasas que conducen a la hiperfosforilación de la proteína tau favoreciendo la aparición de ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad y potenciando el daño neuronal inducido por A β . Paradójicamente, en células tumorales el incremento de colesterol mitocondrial no afecta los niveles óptimos de GSH mitocondrial, gracias a la sobreexpresión del transportador 2-oxoglutarato. En este caso el colesterol ejerce un papel eminentemente antiapoptótico, inhibiendo la permeabilización mediada por Bax y potenciando la resistencia frente a agentes quimioterapéuticos que actúan a nivel mitocondrial. En su conjunto estos estudios muestran la importancia del reservorio de colesterol mitocondrial y cómo pequeñas alteraciones en sus niveles, tanto en células normales como tumorales, puede tener serias implicaciones patológicas.

R18-6

Nuevos mecanismos reguladores de la función de barrera endotelial durante la inflamación

Jaime Millán

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid

La inflamación aumenta de forma local y transitoria la permeabilidad endotelial a moléculas y células del torrente sanguíneo. En el foco de inflamación se secretan citoquinas, como TNF- α , que señala al endotelio de los vasos circundantes, induciendo cambios morfológicos mediados por el citoesqueleto de actina filamentosa. TNF- α induce también un conjunto de receptores de adhesión que incrementan la adhesión leucocitaria y alteran la permeabilidad. No se conoce al completo el conjunto de proteínas endoteliales cuya expresión se modula por TNF- α y participan en la alteración de la morfología y/o función de barrera endotelial en respuesta a la inflamación. Sí se conoce, en cambio, que muchos receptores expresados en respuesta a TNF- α y que participan en esta respuesta inflamatoria endotelial, contribuyen también a la aparición de enfermedades producidas por inflamación crónica tales como la arteriosclerosis o la esclerosis múltiple. En nuestro hemos identificado un conjunto nuevo de proteínas cuya expresión en la superficie del endotelio se modula en respuesta a TNF- α . Durante los últimos años nos hemos centrado en el estudio de algunas de ellas, en particular de un miembro de la familia de las Rho GTPasas, que controlan el citoesqueleto de actina, y de proteínas que regulan la condensación de membranas celulares. El descubrimiento de los mecanismos moleculares que estas proteínas regulan está revelando la importancia de nuevas rutas de señalización en la función de barrera endotelial durante la inflamación, tanto fisiológica como patológica.

R19. Transgénesis en Mamíferos

R19-1

Zinc finger nucleases – A novel tool for targeted gene knockout and gene insertions

Heike Lehmann

Sigma-Aldrich Corporation,

Rational genome engineering in mammalian cells is of enormous potential across basic research, drug-discovery as

well as cell-based medicines. To this end, Sangamo Biosciences and Sigma-Aldrich have partnered to commercialize a novel technology that enables high-frequency genome editing via the application of designed zinc finger nucleases (ZFNs). Within these chimeric proteins the DNA binding specificity of the zinc finger protein determines the site of nuclease action. Such engineered ZFNs are able to recognize and bind to a specified locus and evoke a double-strand break (DSB) in the targeted DNA with high efficiency and base-pair precision. The cell then employs the natural DNA repair processes of either “homology-directed repair (HDR)” or “non-homologous end joining (NHEJ)” to heal the targeted break. These two pathways provide the investigator with the ability to provoke three unique outcomes in genome editing – gene correction, gene deletion and targeted gene addition. Furthermore, the speed and efficiency of this process enables us to knockout multiple genes in the same cell. Drawing from our work with transformed cell lines, primary human cells, and multi-potent stem cells, we will present several examples of single, double and triple gene knockout, as well as targeted gene insertion into native chromosomal loci.

R19-2

Modification of BACs by homologous recombination: an essential tool for molecular embryology

Jaime J. Carvajal

The Institute of Cancer Research, London (UK), and Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD-CSIC), Sevilla

The completion of the human genome in the last decade has provided us with a wealth of information on its structure and function. Around 1.5% of the genome corresponds to coding sequences and 45% to repetitive sequences. The remaining >50% of the genome was originally classed as “junk DNA” but there is increasing evidence that it corresponds to key transcription regulatory elements (enhancers, silencers, insulators, promoters, etc). While in prokaryot organisms the cis-regulatory elements are in close association with the promoters of their respective genes, in eucaryots these can be located far up- or down-stream of their cognate promoters. There is increasing evidence that in the case of developmental regulated genes, complex arrays of cis-regulatory elements can be spread over tens or hundreds of kilobases and thus classical methods of transcriptional regulation analyses or overexpression systems based on plasmid constructs are not adequate. In order to circumvent this, the generation of effective transgenes necessitates the

use of yeast (YACs) or bacterial artificial chromosomes (BACs). The development of techniques for the modification of BACs by homologous recombination in *E. coli* has given us with a set of powerful tools that are routinely used to introduce point mutations, deletions and insertions into these artificial chromosomes that are proving to be invaluable in the analyses of the transcriptional regulation of complex loci in transgenic animals.

R19-3

Aspectos básicos en la identificación, mantenimiento y experimentación con modelos murinos modificados genéticamente

Juan de Dios Hourcade Bueno

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid

Las técnicas de modificación genética han ayudado al desarrollo de la experimentación animal. El objeto de este seminario es dar una visión general de los pasos a seguir en la obtención de un modelo murino genéticamente modificado, el mantenimiento de la línea generada y su conservación a largo plazo.

En el diseño de estos modelos intervienen importantes variables que hay que optimizar y adecuar a las situaciones particulares a resolver. Se ha de seleccionar el tipo de modificación genética a realizar y comprobar la existencia del modelo en algún archivo de líneas transgénicas. El fondo genético sobre el que se va a realizar el modelo determinará, entre otras, la eficiencia reproductiva de la línea y el fenotipo de la misma.

La eficiencia de inserción y expresión del transgen se optimizarán molecularmente, eligiendo los elementos que lo compondrán. Constituido el vector y después de aplicar la tecnología adecuada para su inserción en el genoma murino (microinyección o transformación de células), llega el momento de la determinación del genotipo de los animales generados. Se requiere un adecuado diseño de las sondas para el correcto identificado de los fundadores, así como de la utilización de la técnica apropiada (PCR u otras). Obtenido el modelo, llega el momento del mantenimiento de la línea. Evitaremos sobreexplotar la colonia manteniendo el principio de las 3R. Se recomienda mantener un número determinado de animales tanto en cruce como para experimentación, y además se conservarán embriones y/o gametos congelados con el fin de mantener la línea a disposición de otros investigadores en repositorios internacionales.

El correcto uso de estos y otros parámetros suponen la clave para un buen mantenimiento de las líneas de ratones modificados genéticamente.

R19-4

Generación de una librería de vectores adenoasociados para la obtención de ratones condicionales de tejido

Verónica Jiménez¹, Jesús García², Albert Ribera¹, Estefanía Casaña², Miquel García¹, Anna Pujol¹ y Fàtima Bosch¹

¹*Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, y CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Bellaterra, ²Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra*

La obtención de ratones mutantes (*knock-out*) condicionales específicos de tejido es un proceso complejo cuya mayor limitación es el requerimiento de líneas de ratones transgénicos que expresen la recombinasa Cre en el tipo celular de interés. Así, se debe generar un animal transgénico, mantener una colonia, y, una vez caracterizado, cruzarlos con los animales con el alelo "floxado" para obtener los mutantes deseados. Este proceso es muy largo y además implica un elevado coste económico y de espacio de estabulación de los animales. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de aproximaciones alternativas que permitan optimizar el proceso de obtención de animales mutantes condicionales. Los vectores recombinantes basados en virus adenoasociados (AAV) representan una poderosa herramienta para poder expresar la recombinasa Cre *in vivo* en el tipo celular de interés mediante la combinación de promotores específicos, serotipos y vías de administración. Además, dichos vectores AAV se producen en un corto plazo de tiempo y presentan muy baja inmunogenicidad y nula patogenicidad. Nuestro laboratorio está generando una librería de vectores AAV que permitirán expresar la recombinasa Cre *in vivo* específicamente en diferentes tipos celulares. Actualmente, ya se han generado los vectores AAV necesarios par obtener mutantes condicionales de músculo, hígado, páncreas o cerebro, entre otros. La utilización de esta tecnología posibilitará una importante reducción de los costes y el tiempo necesario para la generación de mutantes condicionales, beneficiando así a toda la comunidad científica.

R19r-5

Generación de nuevos ratones transgénicos como modelos animales de la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica

Diego Muñoz¹, Almudena Fernandez², Marta Cantero³, Carmen Gómez⁴, Sagrario Ortega⁴, María Jesús Bullido¹, Fernando Valdivieso⁵ y Lluís Montoliu³

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid,

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid,

³Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid,

⁴Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid,

⁵Neuron Biopharma SA, Armilla, Granada

Los modelos animales generados hasta la fecha para el estudio de la enfermedad de Alzheimer (EA) adolecen de una serie de limitaciones que impiden usarlos de base experimental para el estudio de la EA esporádica, en particular la mayoría de ellos no consiguen reproducir el nivel de expresión endógeno de los genes cuya expresión se pretende estudiar, lo cual aleja estos modelos del objetivo de intentar entender la etiología de esta enfermedad neurodegenerativa. Otros modelos animales, orientados al estudio de la EA familiar o genética, distan mucho de la situación real, al hacer coincidir en un mismo animal mutaciones en hasta tres loci distintos, combinación que difícilmente se da en la vida real en humanos. El objetivo de este trabajo es superar estas limitaciones, mediante la generación de nuevos ratones transgénicos que expresen el gen *APP* humano correctamente en tejidos endógenos, conservando todas las secuencias reguladoras del mismo, para que el nivel de expresión responda al característico del *locus*, de forma que sea posible su utilización como modelo experimental de la enfermedad, y en el que puedan ensayarse las consecuencias de distintos factores determinantes o potenciadores que permitan averiguar las causas de la enfermedad y combatirlas eficazmente. Con este fin hemos modificado un cromosoma artificial de levaduras (YAC) portador del *locus APP* humano y eliminado otro gen colindante cuya expresión podría interferir. Adicionalmente hemos incorporado mutaciones conocidas en el *locus APP* (variante sueca), relacionadas con casos de EA familiar. Mediante diversos procedimientos de transgénesis hemos generado varias líneas de ratones transgénicos, portadoras de estos YAC, cuya expresión y fenotipo están siendo valoradas.

R19-6

Transgénesis estable por inyección y electroporación in vivo de DNA en línea germinal masculina de ratón: reproducción de la metodología y análisis de sus limitaciones para su posterior uso en estudios de función génica en retina

Santiago López Begines y Ana Méndez Zunzunegui

IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat

Objetivo: Reproducir la metodología de transgénesis estable por electroporación del DNA *in vivo* desarrollada por S. Majumdar (*Nature Methods* 2008;5: 601) y analizar su eficiencia, con el fin de adaptarla a estudios de función génica en retina. **Métodos:** El plásmido pL-UG (expresión de EGFP dirigida por el promotor de la ubiquitina C) linearizado se inyectó y electroporó en testículo de ratón (C57Bl) a día 30 posnatal. Tras un período de 35 días (duración de un ciclo de conversión de espermatogonia primaria a espermatozoides) los ratones fueron cruzados y la F1 fue analizada para la integración del transgén y la expresión de GFP. **Resultados:** De diez ratones operados, seis dieron lugar a progenie positiva por PCR en la F1 (en un porcentaje del 5-10% del total); dos produjeron progenie negativa y dos fueron infértiles. De los ratones positivos en F1 aquellos que fueron cruzados de nuevo transmitieron el transgén a la F2, lo que apunta a la integración estable del transgén. De los ratones que integraron el transgén (F1 o F2) ninguno expresó GFP a niveles suficientes para permitir su detección por fluorescencia en tejido tras su excitación a 488 nm. La expresión de GFP fue detectada por Western blot en muestras de hígado en un pequeño número de casos, a un nivel aproximadamente 500 veces menor que en líneas transgénicas establecidas de forma convencional. **Conclusiones:** La transgénesis por electroporación del DNA en línea germinal masculina es factible pero ineficiente. La principal limitación de la técnica reside en el silenciamiento del promotor del transgén durante el proceso. En futuros experimentos haremos uso de elementos aisladores de DNA para flanquear el transgén y de promotores más fuertes.

R20. Transportadores de Membrana

R20-1

The sodium/iodide symporter (NIS): an unending source of surprises

Nancy Carrasco

Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York (USA)

The Na⁺/I⁻ symporter (NIS) is a key plasma membrane protein that mediates active I⁻ transport in the thyroid. Its activity had been known and used clinically for over 70 years in the diagnosis and treatment of thyroid disease with radioiodide when our group isolated the cDNA encoding it in 1996. We have shown that NIS is not a thyroid-specific protein: it is expressed in other tissues, such as lactating breast and, significantly, breast cancer and its metastases. Although NIS-mediated I⁻ transport is decreased in thyroid cancer as compared to healthy thyroid tissue, we discovered that NIS is still expressed in the majority of thyroid cancers. The identification of NIS positions critical for cell surface localization will be discussed.

NIS mediates the movement of Na⁺ and I⁻ with a 2:1 stoichiometry, resulting in a net transfer of positive charge into the cell (electrogenic transport). NIS translocates different anion substrates with different stoichiometries, as Na⁺/perchlorate (or perrhenate) transport is electroneutral—a property unprecedented in any transporter. That NIS actively transports the pollutant perchlorate is relevant for public health, as perchlorate levels have been high in the drinking water in many areas of the US. Valuable information on NIS has been obtained by the molecular characterization of NIS mutants that cause congenital I⁻ transport defect in patients. A study of the G93R NIS mutant has revealed unexpected NIS properties that may prove useful in gene transfer studies in which NIS is expressed in tissues that do not express it endogenously, thus rendering them susceptible to destruction with radioiodide. We propose a mechanism in which changes from an outwardly open to an inwardly open conformation during the transport cycle use G93 as a pivot.

R20e-2

Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of solid tumors to drug therapy: a transportome approach

N. Grañé-Boladeras¹, S. Pérez-Torras¹, M.R. Romero², P. Martínez-Becerra², L. Muñoz-Bellvís², M.A. Serrano², J.J. Lozano³, J.J.G. Marín², A. Mazo¹ y M. Pastor-Anglada¹

¹*Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB) and CIBER EHD (Acción Transversal en Cáncer), Barcelona,*
²*Experimental Hepatology and Drug Vectorialization Group, University of Salamanca and CIBER EHD (Acción Transversal en Cáncer), Salamanca,*
³*Bioinformatics Platform, CIBER EHD, Barcelona*

Introduction: Drug transport across the plasma membrane is mediated by a wide range of membrane proteins, which are crucial for their cytotoxic action. To establish the role these proteins might play in anticancer therapy we performed a “transportome” transcriptomic approach on cell lines derived from gastrointestinal tumors.

Aims: The aim of this study was to identify a discrete set of genes whose expression levels in tumor cells may allow prediction of sensitivity/resistance to chemotherapy.

Methods: 15 tumor cell lines representative of gastrointestinal cancer were chosen in order to determine differences in gene expression and cytotoxicity. Based upon the most used treatments in therapy against digestive tumors, 6 anticancer drugs were used for cytotoxicity assays. Transcriptomic analysis was performed using microfluidic cards (Applied Biosystems). Cards included 43 genes encoding plasma membrane transporters/channels, as well as other genes selected based upon their role in drug metabolism, DNA repair and apoptosis.

Results: Based upon gene expression correlations among the different cell lines, we could identify several novel networks connecting membrane transporters with known sets of genes implicated in apoptosis/DNA repair. On the other hand, the analysis of possible correlations among gene expression patterns and cell survival following drug treatments, resulted in the identification of sets of genes with a potential predictive capacity, now waiting to be validated.

Conclusions: Bioinformatic analysis of these results anticipate the existence of sets of genes whose expression correlate with chemosensitivity, in a manner which appears to be independent of the origin of the cell line, thus proving to be probable common predictors of digestive cancer chemotherapy.

R20e-3

La quimiorresistencia puede ser inducida por activación de FXR independiente de ácidos biliares en células hepáticas e intestinales

Javier Vaquero Rodríguez¹, Elisa Herráez Aguilar¹, Ruben Rosales Rodríguez¹, Marta Rodríguez Romero², Ester González-Sánchez¹, Jordi Muntané³, Oscar Briz Sánchez⁴ y José Juan García Marín²

¹Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ³Unidad de Investigación del Hígado, Universidad Reina Sofía, Córdoba. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ⁴Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca

Introducción: Algunas proteínas ABC limitan la utilidad de la quimioterapia antitumoral. Objetivo: Investigar su expresión en respuesta al tratamiento con cisplatino. **Métodos:** Se realizó RT-QPCR y WB en células de hepatoblastoma (HepG2), hepatocarcinoma (Alexander) y adenocarcinoma colorrectal (Caco-2 y LS174T). **Resultados:** El cisplatino a IC50 estimuló la expresión de varias proteínas ABC, de forma especialmente marcada (x500 para ABCC2) en la sublínea LS174T/R refractaria al cisplatino. El promotor de ABCC2 (prMRP2) completo o parcial se clonó en fase con la ORF de luciferasa. Su transfección en LS174T y LS174T/R reveló la capacidad del cisplatino para activar prMRP2 de forma dependiente de la zona conservada. La actividad basal de prMRP2 era mayor en LS174T/R. La expresión de p53, c-Myc, API, YB1, NRF2, RAR α y PXR era similar en LS174T y LS174T/R, mientras que los niveles de c/EBP β , HNF1 α , HNF3 β y HNF4 α aumentaron (x5) y los de FXR (x200) y SHP (x50) mucho más en LS174T/R. Cuando las células Alexander se transfectaban con FXR se redujo su sensibilidad a la toxicidad de: cisplatino, doxorubicina, mitomicina C y dicromato potásico, pero no de palitaxel ni acetaminofeno. La protección se potenciaba por GW4064. En células transfectadas con FXR y en hepatocitos humanos, el cisplatino inducía, aunque con menor eficacia que el GW4064, genes diana de FXR (SHP, BSEP y OST β). Además, en HepG2 (que expresan FXR) y en células Alexander transfectadas, el cisplatino indujo la expresión

de luciferasa dirigida por un elemento IR-1. **Conclusión:** La activación de FXR independiente de ácidos biliares puede ser desencadenada por exposición a algunos compuestos tóxicos, lo que puede jugar un papel en el desarrollo de quimiorresistencia en células tumorales hepáticas e intestinales.

R20-4

Calmodulin independent trafficking of Kv7.2 channels

Araitz Alberdi Gonzalez¹, Juan Camilo Gómez Posada², Paloma Aivar Mateo³, Alessandro Alaimo¹, Ainhoa Etxeberria⁴, Juncal Fernández Orth¹, Carolina Gomis Perez¹, Pilar Areso⁵ y Alvaro Villarreal¹

¹Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EHU), Leioa, ²Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen (Germany), ³Instituto Cajal, Madrid, ⁴Department of Neurology, University of California, Genentech Hall, San Francisco (USA), ⁵Departamento de Farmacología UPV-EHU, Leioa

Kv7.2 and Kv7.3 channels are the main subunits that give rise to the M-current, which plays a prominent role in the control of neuronal excitability. Helices A and B in the C-terminus constitute the calmodulin (CaM) binding site (CaMBD), and CaM binding is required for endoplasmic reticulum (ER) exit and subsequent surface expression. In addition, a role for CaM as a biosynthesis and assembly regulator has been proposed. Some mutations that cause Benign Familial Neonatal Convulsions (BFNC), a dominantly inherited human epilepsy, impair the Kv7.2-CaM association leading to increased ER retention and reduced surface expression.

The mechanism of CaM-mediated Kv7.2 ER exit regulation is unknown. Other proteins that control ER exit do so by occluding retention/retrieval signals. To test the hypothesis that CaM employs a similar mechanism we have searched for regions within the CaMBD that control surface expression. Consistent with the hypothesis, we have found that helix B prevents surface expression of a surface expression reporter protein. We have found that a mutation within helix B apparently neutralizes the hypothetical retention signal and, as a consequence, Kv7.2 channels can exit the ER and reach the plasma membrane without the need of CaM-binding.

R20r-5

Evaluación in vitro de la utilidad de derivados de ácidos biliares en el tratamiento del colangiocarcinoma

Elisa Lozano Esteban¹, María Jesús Monte Río², Silvia Jiménez³, Beatriz Castaño³, Felipe Jiménez⁴, Francisco González San Martín⁴, José Juan García Marín² y Rocío I. Rodríguez Macías²

¹Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos, Universidad de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca, ³Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, ⁴Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de Salamanca. Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Salamanca

Antecedentes: El colangiocarcinoma (CGC) es un tumor con elevada mortalidad debido, en parte, a la dificultad de realizar un diagnóstico precoz que posibilite su resección y a la falta de respuesta a la quimioterapia. **OBJETIVO:** Investigar la expresión del transportador ASBT y por lo tanto la posibilidad de utilizar ácidos biliares como lanzaderas para vectorizar fármacos citostáticos hacia células de CGC. **Métodos:** Se utilizaron 2 líneas celulares comerciales de CGC humano (TFK-1 y HuH-28), y otras 2 de rata obtenidas en nuestro laboratorio a partir de tumores inducidos químicamente por administración de tioacetamida en el agua de bebida. Los niveles de expresión de los genes de interés se determinaron por RT-QPCR, WB e inmunofluorescencia. Se determinó la capacidad de las líneas celulares de captar [³H]-taurocolato y la actividad citostática de derivados de ácidos biliares (mediante el test de MTT) tras 72 h de exposición a concentraciones crecientes de Bamet-UD2, Bamet-R2 o cisplatino. **Resultados:** Las líneas celulares REUSAL-C44 y REUSAL-C49 obtenidas de tumores de rata se caracterizaron por la expresión de marcadores específicos de colangiocitos malignizados (CK7, Neu y GSTpi) y la ausencia de marcadores de otras células hepáticas (Ntcp, albúmina y CD163). Los niveles de expresión de ASBT fueron elevados en las líneas TFK-1 (x3 vs hígado sano) y REUSAL-C44 (x2) y muy bajos en las células Huh-28 y REUSAL-C49. Estos resultados se correlacionaron con la capacidad de las células de captar ácido taurocólico y su sensibilidad a Bamet-UD2 y Bamet-R2. **Conclusión:** La expresión de ASBT en CGC podría utilizarse como herramienta para la vectorización de derivados citostáticos de ácidos biliares con el objetivo de elevar los niveles intracelulares de fármaco en el tumor.

R20-6

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es secretada a través del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) en *Escherichia coli* enteropatogénica

Laura Aguilera, Rosa Giménez, Josefa Badia, Juan Aguilar y Laura Baldomà

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

La proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una proteína citosólica implicada en el metabolismo energético de la célula, que sin embargo ha sido identificada en la superficie y en el medio extracelular de microorganismos patógenos, entre ellos *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC). Esta proteína carece de secuencia señal y dominio de anclaje a membrana, y se desconoce cuál es el mecanismo de secreción por el que es exportada. En bacterias Gram-negativas existen al menos ocho de estos sistemas (T1SS–T8SS) que reconocen diferentes estructuras en las proteínas sustrato.

En este trabajo, el análisis por Western blot de la secreción de GAPDH en cepas mutantes para diferentes proteínas del T3SS, como EscN y SepD, ha permitido identificar este sistema, exclusivo de cepas patógenas, como el responsable de la secreción de GAPDH en EPEC en medio de cultivo DMEM. Mutaciones en *escN* (codifica la ATPasa del sistema) anulan la secreción de GAPDH mientras que mutaciones en *sepD* producen su hipersecreción. Este patrón es coincidente con el de las proteínas efectoras translocadas a la célula huésped a través de este sistema.

Ensayos de *pull-down* muestran que GAPDH es capaz de interactuar con la chaperona CesT, propia del T3SS. Esta interacción ocurre sin la participación de EscN. Dado que CesT está implicada en el reconocimiento de los sustratos que han de ser exportados a través del T3SS, se está analizando la interacción de esta chaperona con diferentes dominios de GAPDH, con el objetivo de caracterizar el mecanismo por el cual GAPDH es reconocida por componentes del T3SS para ser secretada en cepas EPEC.

Este trabajo constituye la primera descripción del exporte de una proteína *housekeeping* a través del T3SS en EPEC.

R20r-7

Función del transportador TRK1 en la tolerancia a sal de la levadura *Hansenula polymorpha*

María del Carmen Álvarez, Tránsito García-García y José Ramos

Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba, Córdoba

La levadura *Hansenula polymorpha*, perteneciente al grupo de las *Saccharomycetaceae*, posee interés básico y aplicado por diferentes razones entre las que cabe mencionar su capacidad para usar metanol y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. La información disponible sobre la homeostasis de potasio en esta levadura es prácticamente nula. Nuestro grupo, en colaboración con el del Dr. Siverio (ULL), ha realizado un primer estudio en el que se identifican dos transportadores de potasio en la membrana plasmática (HAK1 y TRK1) y se propone que HAK1 funciona como un transportador con alta afinidad necesario para crecer a bajas concentraciones de potasio (Cabrera *et al.* Enviado).

En este trabajo hemos profundizado en el estudio de la posible función de TRK1. Utilizando tanto mutantes simples $\Delta hak1$ y $\Delta trk1$ como el doble mutante $\Delta hak1/\Delta trk1$, hemos realizado análisis de crecimiento, contenido y flujo de cationes, y volumen en células sometidas a diferentes condiciones. Los resultados que se muestran en el póster correspondiente indican que, al contrario de lo que sucede con HAK1, TRK1 posee un papel fundamental en la tolerancia a sal, lo que coincide con la idea de que los transportadores TRK pueden tener funciones adicionales a la de transportar potasio (Benito *et al.* 2011). La coexistencia de diferentes transportadores de potasio en un mismo organismo no ha sido explicado de manera concluyente, nosotros proponemos que, en el caso de *H. polymorpha*, HAK1 y TRK1 poseen funciones claramente diferenciadas.

Nota: Agradecimientos a J.M. Siverio y E. Cabrera por las cepas de *H. polymorpha* y por sus comentarios. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BFU2008-04188-C03-03 del Ministerio de Ciencia e Innovación (JR).

Pósters

Los resúmenes que optaban a alguno de los premios del XXXIV Congreso de la SEBBM llevan la correspondiente letra en su referencia: **e** (premio EACR al mejor póster sobre investigación en cáncer), **m** (premio Margarita Lorenzo-Fundación Lilly) y **r** (premio Roche al mejor póster)

P01. Apoptosis

P01-1

LRRK2 mutant G2019S exacerbates basal autophagy and sensitizes cells against neurotoxins related to Parkinson's disease

José Manuel Bravo San Pedro¹, Rubén Gómez Sánchez¹, Mireia Niso Santano¹, Elisa Pizarro Estrella¹, Rafael Gamero Negrón¹, Adolfo López de Munain², José Manuel Fuentes Rodríguez¹ y Rosa Ana González Polo¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura, Cáceres,*

²*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Instituto Biodonostia. Servicio de Neurología, Hospital Donostia, San Sebastián*

Mutations in leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) are a major cause of familial Parkinsonism. The G2019S mutation of LRRK2 is one of the most prevalent. Deregulation or malfunction of autophagy in nerve cells is thought to be one of the possible causes of Parkinson's disease. Furthermore, several studies indicate that elevated levels of autophagic activity can trigger a process of cell death.

In this study, we observed that fibroblasts from Parkinson disease patients with G2019S mutation of LRRK2 showed autophagic activity levels above those observed in fibroblasts without the mentioned mutation. We have also seen that the baseline differences in autophagy levels are due to a path independent mTOR, and differences are reduced to stimulate autophagy by mTOR-dependent classical path. In this sense, we have also demonstrated that LRRK2 mutant cells are more sensitive to a stimulator of cell death such as MPP+ neurotoxin, widely used in parkinsonian models to induce autophagy and apoptosis.

These results suggest a possible role for LRRK2 in the regulation of autophagy and could be partly responsible for the increased sensitivity of cells that have the G2019S mutation, as compared to control cells.

Note: The funding was from Junta de Extremadura (PRIS10013 and GR10054); Instituto de Salud Carlos III (CB06/05/0041) and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-14993). R.G-S. was supported by a FPU predoctoral fellowship (Ministerio de Educación, Spain), J.M.B-S and R.G-N. were supported by a predoctoral fellowship (Junta de Extremadura, Spain), M.N-S. was supported by a postdoctoral fellowship (Junta de Extremadura, Spain), RA.G-P. was supported by a Miguel Servet contract (Instituto de Salud Carlos III). Thanks to assistance provided by FUNDESALUD.

P01e-2

Inducción de apoptosis por daño oxidativo en células de adenocarcinoma de colon humano por los ácidos biliares desoxicólico y quenodesoxicólico

Juan Ignacio Barrasa López, Angélica Santiago Gómez, Elisa Navarro González de Mesa, Nieves Olmo López, Javier Turnay Abad y Maria Antonia Lizarbe Iracheta

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Los componentes del lumen intestinal, como ácidos biliares o ácidos grasos de cadena corta, son esenciales para la homeostasis del epitelio colónico. La citotoxicidad de los ácidos biliares se ha relacionado con daño en la membrana a través de sus efectos detergentes, así como con otros mecanismos como la inducción de estrés oxidativo. La exposición continua a altas concentraciones de ácidos biliares puede permitir el crecimiento selectivo de células resistentes a la apoptosis inducida por estos agentes, incrementando así el riesgo de desarrollo de tumores. Se ha analizado el efecto del DCA y CDCA en las células de adenocarcinoma de colon humano BCS-TC2. Ambos ácidos biliares promueven la muerte celular tras períodos cortos de exposición (<2h), siendo este efecto más marcado en el caso del CDCA. Este hecho se ha comprobado a través de diferentes características típicas de apoptosis, como desadhesión celular, degradación del DNA internucleosomal, activación de caspasas y pérdida de la asimetría de membrana. Estos eventos ocurren principalmente a través de la ruta apoptótica mitocondrial al detectarse activación de las caspasas -3 y -9 pero no de la caspasa-8. Esta hipótesis está apoyada por la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y el incremento en la producción de ROS. Además, estas perturbaciones mitocondriales parecen estar desencadenadas por un incremento inicial de ROS debido a la activación por ácidos biliares de enzimas asociadas a membrana (NADPH oxidasas y PLA₂). Por tanto, se puede concluir que los ácidos biliares, principalmente el CDCA, son capaces de desencadenar la apoptosis inicialmente a través de un incremento en la producción de ROS, y que los daños mitocondriales derivados de este estrés oxidativo activan la ruta intrínseca de apoptosis.

P01r-3

Acción quimiosensibilizadora de polifenoles naturales en combinación con la droga antileucémica trióxido de arsénico (Trisenox™)

Gloria Pilar Simón García de Mora, María Cristina Estañ Omaña, Eva Calviño Vanegas, Elena de Blas Brotons y Patricio Aller Tresguerres
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid

El trióxido de arsénico (ATO, Trisenox™) es una droga mitocondriotóxica de eficacia clínica frente a la leucemia promielocítica aguda y de potencial interés frente a otros tipos de leucemias, aunque ello requeriría la aplicación de estrategias de quimiosensibilización. La citotoxicidad del ATO en modelos de células leucémicas mieloides humanas (U937 y HL60) se incrementa por combinación con concentraciones subcitotóxicas de polifenoles dietéticos naturales tales como quercetina, naringenina, epigallocatequina-3-galato (EGCG), curcumina y resveratrol. Tomando como ejemplo la curcumina: (i) La potenciación de la citotoxicidad se observa también en combinación con la droga mitocondriotóxica lonidamina, pero no con agentes específicos del DNA (p.e., cisplatino); (ii) se explica por activación de la apoptosis en la ruta “intrínseca” (mitocondrial); (iii) conlleva sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y atenuación de apoptosis por agentes antioxidantes; (iv) no implica modificación de las actividades de proteínas quinasas JNK y p38-MAPK ni de actividad NF- κ B, pero sí conlleva activación de las ERK, que restringen la eficacia de la apoptosis (según resultados obtenidos con los inhibidores PD98059 o U0126), así como inactivación de la ruta PI3K/Akt, que incrementa la eficacia apoptótica (según resultados obtenidos con el inhibidor de PI3K LY294002). La acción prooxidante, y ocasionalmente la modulación de proteínas quinasas, son también observados con los otros polifenoles estudiados, salvo el resveratrol pero este es el único que altera el ciclo celular, inhibiendo la transición en fase S. Los factores moleculares determinantes de este efecto ciclo-específico están bajo estudio.

P01-4

Efectos apoptóticos producidos por esculetina en células de leucemia promielocítica aguda humana

Virginia Rubio, Daniel Morales, Irene Gañán-Gómez, Elia Moreno-Cubero, Pilar Sancho, Angel Herráez y José Carlos Díez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

La inducción de apoptosis puede resultar una buena estrategia terapéutica frente a células tumorales. La esculetina (6,7-dihydroxicumarina) es una cumarina con actividad antitumoral cuyo mecanismo de acción no se ha estudiado hasta ahora en células de leucemia promielocítica humana.

El tratamiento de células NB4 con esculetina (0,1 o 0,25 mM) durante 5 y 14 horas produjo reducciones de viabilidad (10-20%) que aumentan con el tiempo de tratamiento (25% a 19 h y 35% a 24 h). La viabilidad celular decrece gradualmente tras el tratamiento con concentraciones crecientes de esculetina (0,02 a 0,5 mM) durante 19 horas. La esculetina induce fragmentación de DNA: el número de células con contenido subdiploide de DNA se incrementó de forma dependiente del tiempo tras el tratamiento con esculetina 0,1 o 0,25 mM durante 5, 14, 19 y 24 horas. También se produjo un incremento en el contenido subdiploide de DNA en tratamientos con esculetina de 0,02 a 0,5 mM durante 19 horas. Los análisis citométricos con Anexina-V-FITC muestran la aparición de apoptosis temprana y tardía.

La apoptosis inducida por esculetina se produce con la activación de caspasas 3 y 9, sin cambios significativos en los niveles de p53 y decreciendo la relación Bcl2/Bax al incrementar la concentración de esculetina. Estos tratamientos con esculetina durante 19 horas muestran incrementos graduales de la expresión de Erk y P-Erk1/2, permaneciendo constantes los niveles de Akt e incrementándose los de p-Akt. En conclusión, la esculetina es un citotóxico que induce apoptosis en células leucémicas humanas NB4 con activación de caspasas 3 y 9 y alteraciones en la fosforilación de las quinasas Erk y Akt.

Nota: El trabajo se financió en parte con ayudas CCG06-UAH/SAL-0672, CCG10-UAH/SAL-5966 y FIS PI060119.

P01-5

Efecto sinérgico de proteínas del plasma seminal y melatonina como protectores de apoptosis en espermatozoides ovinos

Noelia Mendoza, Juan Domingo, Rosaura Pére-Pé, Jose Álvaro Cebrián-Pérez y M^a Teresa Muiño-Blanco

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - IUCA, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

En este estudio se ha investigado la hipótesis de que la apoptosis en espermatozoides está relacionada con los daños de la criopreservación. Se ha estudiado el posible

efecto protector de las proteínas del plasma seminal completas (PPS) y la fracción 6 (F6) descritas como protectoras de los espermatozoides frente a los daños del frío, y la melatonina (M), individual y conjuntamente, frente a la acción apoptótica del ácido Betulinico (AB) en espermatozoides ovinos. Después de incubar las muestras (4×10^7 sperm/ml; 15 min/temperatura ambiente) con M, PPS, F6, M+PPS y M+F6, se incubaron otros 30 min con 60 mg/ml AB. La viabilidad se determinó con CFDA/IP. Como marcadores de apoptosis se determinó la inversión de fosfatidilserina (FS) con anexina V/IP; el daño en el DNA mediante TUNEL; y la actividad caspasa mediante el kit Vibrant FAM Caspase-3 and -7 Assay con homodímero de etidio. La capacitación se evaluó con clorotetraciclina (CTC). La adición de AB aumentó el porcentaje de espermatozoides con FS invertida, caspasas activas y positivos a TUNEL, y disminuyó el de viables. La M, las PPS y la F6 protegieron de los daños inducidos por el AB, aumentando la proporción de espermatozoides viables y reduciendo los marcadores apoptóticos y el estado de capacitación. Las PPS solas y asociadas con M disminuyeron significativamente el porcentaje de espermatozoides con DNA dañado (8% y 12% vs 18%) y aumentaron el de no capacitados vivos (36% y 36% vs 18%). Estos resultados indican que las PPS y la M actúan de modo sinérgico protegiendo a los espermatozoides frente a la apoptosis. *Nota:* Financiado por CICYT-FEDER AGL 2008-01476, DGA A-26 and DGA 040/08.

P01-6

Biointeractomic scaffold hovering over apoptotic cytochrome c

Jonathan Martínez Fábregas, Irene Díaz Moreno, Silvia Rubio Novella, Antonio Díaz Quintana, Manuel Hervás Morón, José Antonio Navarro Carruesco y Miguel Ángel De la Rosa Acosta
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, cicCartuja, Universidad de Sevilla y CSIC, Sevilla

The role of cytochrome *c* in apoptosis is well-established, but its participation in signaling pathways *in vivo* remains still poorly understood due to its essential role in mitochondrial respiration. Upon an apoptotic stimulus, cytochrome *c* is released from the mitochondria into the cytosol, where it interacts with APAF1 and leads to apoptosome formation and caspases activation [1]. Other unexplored functions of cytochrome *c* in apoptosis have been proposed based on the resistance that cytochrome *c* knockout mutants exhibit to agents that activate the cytochrome *c*-independent apoptotic pathway [2]. To gain further insight into the involvement of cytochrome *c* in apoptosis, here we have used human cytochrome *c* as bait in an affinity chromatography-based proteomic approach

aimed at identifying new putative cytochrome *c* partners. The *in vivo* interaction and localization of the complexes formed during apoptosis by cytochrome *c* with its novel partners identified by proteomics have been further afforded by Bimolecular Fluorescence Complementation. Our results suggest that cytochrome *c* interacts with an ample set of pro-survival and anti-apoptotic proteins, thereby interfering with cell survival signaling pathways and unlocking apoptosis. Thus, extra-mitochondrial cytochrome *c* seems to be responsible for avoiding the spatial and temporal co-existence of pro- and anti-apoptotic signals in cells, so letting the appropriate progress of the apoptotic program. [1] Li P. *et al.*: *Cell* 1997; 91: 479-89. [2] Vempati U.D. *et al.*: *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1771-83.

P01-7

Influencia de PTTG1 en la apoptosis inducida por paclitaxel en células de cáncer de próstata

Carolina Castilla Ramírez¹, M. Luz Flores de Mera¹, Béatrice Marquez-Garrido¹, María D. Tortolero García², Francisco Romero Portillo², Miguel A. Japón Rodríguez¹ y Carmen Sáez Torres¹

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, ²Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla

La securina humana, PTTG1, interviene en la separación de las cromátidas en la transición metafase-anafase. Paclitaxel, una droga usada en el tratamiento de distintos tumores, produce una parada del ciclo en G2/M, bloqueando el huso mitótico y la división celular. Tras la parada, las células tumorales pueden morir en mitosis o salir de mitosis por deslizamiento (*slippage*) hacia un estado G1 tetraploide (duplicación del material genético sin citocinesis), desde el que pueden morir por activación de la vía intrínseca de apoptosis, para iniciar una nueva división. Estudiamos la influencia de PTTG1 sobre la apoptosis y el ciclo celular en dos líneas de cáncer de próstata, PC3 y LNCaP, tratadas con paclitaxel. El silenciamiento de PTTG1 produce una disminución de la apoptosis en las dos líneas celulares, asociada a una disminución del porcentaje de células en G2/M tras tratamiento con paclitaxel. Por el contrario, la transfección con PTTG1 tiene efectos opuestos en cada línea. En PC3, la transfección con PTTG1 y el tratamiento con paclitaxel inducen un aumento de células en G2/M y una disminución de la apoptosis. En LNCaP, este tratamiento aumenta las células en G2/M, pero asociado a un incremento de la apoptosis. Los datos de proteínas relacionadas con el ciclo y FISH indican que, en

células PC3, la apoptosis está asociada con la aparición de deslizamiento. La transfección con PTTG1 y el tratamiento con paclitaxel inducen un aumento de células en mitosis y, por tanto, inhibición del deslizamiento y de la apoptosis. Por el contrario, las células LNCaP sufren apoptosis durante la parada en mitosis inducida por paclitaxel y la transfección con PTTG1 aumenta el porcentaje de células en mitosis tras el tratamiento y la apoptosis asociada.

P01r-8

Alteración de la membrana lisosomal y liberación de catepsinas tras la activación de calpaínas durante el destete

Teresa Arnandis, Ivan Ferrer-Vicens, Concha García, Vicente J. Miralles, Elena R. García-Trevijano, Luis Torres, Juan R. Viña y Rosa Zaragoza

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Fundación Investigación Hospital Clínico Valencia- INCLIVA. Universidad de Valencia, Valencia

La involución de la glándula mamaria tras la lactancia se caracteriza por apoptosis del epitelio secretor alveolar, degradación de la membrana basal y diferenciación de adipocitos, constituyendo un modelo fisiológico idóneo para el estudio de la remodelación tisular. Centrándonos en el estudio de la apoptosis, observamos que a lo largo de la involución, existe un incremento de los niveles de expresión de Capn1 y Capn2 regulado por NF- κ B. A su vez, el aumento de calcio intracelular que se produce en el destete, activa estas proteasas dependientes de calcio, provocando un incremento de su actividad. Ya se ha visto que las calpaínas se asocian a membranas y degradan proteínas de la misma, tanto en la mitocondria como en el núcleo, pero se desconoce exactamente cuáles son sus sustratos y su efecto en el lisosoma. En este estudio se ha observado que LAMP2a, una proteína integral de la membrana lisosomal, constituye una diana directa de las calpaínas. Con el fin de identificar otras posibles dianas, se aislaron lisosomas y se trataron con calpaina 2 recombinante, para un posterior análisis proteómico (2D DIGE). Entre dichas dianas cabe destacar VATB2, cuya función sería la de mantener el pH ácido del interior del lisosoma. Los resultados obtenidos demuestran que las calpaínas activas en la involución de la glándula mamaria escinden proteínas de la membrana lisosomal, entre ellas LAMP2a y VATB2, cuya ruptura podría provocar la desestabilización de esta membrana, con la consiguiente liberación de catepsinas, facilitando la apoptosis por la vía lisosomal.

Nota: Agrad. BFM2010/18253; GVPROMETEO 2010-075; PS09- 02360.

P01-9

Oxaliplatino es un inductor de apoptosis altamente efectivo en linfoma de células del manto

Antònia Obrador-Hevia¹, Lamiae Belayachi¹, Carlos Ordinas¹, José Rodríguez², Priam Villalonga¹ y Silvia Fernández de Mattos¹

¹Grupo de Biología Celular del Cáncer. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS). Universitat de les Illes Balears, Palma, ²Hospital Severo Ochoa, Madrid

El linfoma de células del manto (LCM) es un linfoma agresivo que supone el 5% de los linfomas no-Hodgkin. Se caracteriza por la traslocación cromosómica t(11;14) (q13;q32), que conduce a la sobreexpresión de ciclina D1. El tratamiento actual, combinando altas dosis de radio y quimioterapia, ha mejorado la supervivencia, pero la enfermedad se considera prácticamente incurable debido a las recaídas continuas, lo que evidencia la necesidad de una mejora terapéutica. Estudios anteriores han demostrado la eficacia de un nuevo tratamiento, GEMOX-R (gemcitabina, oxaliplatino y rituximab), en un grupo de pacientes con LCM refractario y reincidente. En el presente estudio hemos evaluado la eficacia de GEMOX-R en modelos in vitro y ex vivo, utilizando un panel de líneas celulares así como cultivos primarios de LCM. Los ensayos de viabilidad celular indican que oxaliplatino es el fármaco más activo de la combinación. Tras el tratamiento con oxaliplatino se evidencia el incremento en la fracción de células apoptóticas, así como la inducción de actividad caspasa, tanto en líneas celulares como en cultivos primarios. El efecto de oxaliplatino es independiente del *status* de p53. El análisis molecular de células tratadas con la droga demuestra la disminución de diferentes proteínas antiapoptóticas. El tratamiento combinado con inhibidores específicos de vías de estrés y supervivencia indica que las vías analizadas no participan en la respuesta celular a oxaliplatino. La inhibición de la actividad caspasa sí consigue revertir la muerte celular causada por el fármaco. En conjunto, los resultados obtenidos refuerzan la aplicación de oxaliplatino en el tratamiento de pacientes de LCM, como un fármaco altamente efectivo en la inducción de muerte celular en este subtipo agresivo de linfoma.

P02. Bases Moleculares de la Patología

P02-1

A systematic review on angiogenesis related rare diseases

Luis Rodríguez Caso¹, Francisca Sánchez Jiménez², Ana Rodríguez Quesada² y Miguel Ángel Medina Torres²

¹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, ²Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, y CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga

Angiogenesis, the formation of new vessels from preexisting ones, is essential during ontogenic development and is related to many important physiopathological processes in the adult. In fact, a persistent and deregulated angiogenesis is a required event for many diseases and pathological situations, including cancer progression and metastasis. Some rare diseases are also angiogenesis-related pathologies. However, there is a lack of an exhaustive review on the topic. The main purpose of this work is to carry out a bibliometric study to determine what (and how much) scientific information concerning angiogenesis-related rare diseases can be extracted from available sources. After exhaustive searches in bibliographic databases, preselected data were filtered by selecting only those articles on rare diseases with an Orpha number hosted in the *Orphanet* web. The selected bibliographic references were further curated manually. With the selected references, a critical reading and analysis was carried out allowing for an identification and classification of angiogenesis-related rare diseases, the involved genes and the drugs available for their treatment, all on the basis of the information available in *Orphanet* database. *Note:* Our experimental work is supported by grants SAF 2008-02522, PS09/02216 and TRACE PT2008-0145 (Spanish Ministry of Science and Innovation), and PIE CTS-3759, P07-CVI-02999, CVI-6585 and funds from group BIO-267 (Andalusian Government). The "CIBER de Enfermedades Raras" is an initiative from the ISCIII (Spain).

P02-2

Regulación transcripcional de la biogénesis mitocondrial inducida por tiazolidinedionas en tejido adiposo blanco: papel del coactivador PGC-1 α

Rosario Pardo¹, Natàlia Enguix¹, Jaime Lasheras¹, Juan E. Feliu¹, Anastasia Kralli² y Josep A. Villena¹
¹Vall d'Hebron-Institut de Recerca, Barcelona, ²The Scripps Research Institute, La Jolla (USA)

Diversos estudios sugieren que una disminución de la función mitocondrial podría contribuir a la etiología de la resistencia a insulina y la diabetes de tipo 2. Dado el papel relevante de PGC-1 α en el control de la biogénesis y función mitocondriales, se ha sugerido que bajos niveles de PGC-1 α , como los observados en pacientes diabéticos, podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, el tratamiento con tiazolidinedionas (TZD) incrementa la expresión de PGC-1 α y la masa mitocondrial en tejido adiposo blanco (TAB) de individuos diabéticos y mejora la sensibilidad a la insulina. Ello ha llevado a sugerir que las TZDs actúan sobre la resistencia a insulina promoviendo biogénesis mitocondrial a través de PGC-1 α . Con el objetivo de estudiar el papel de PGC-1 α en la biogénesis mitocondrial inducida por TZD en TAB, hemos generado un modelo de ratón en el que el gen de PGC-1 α ha sido inactivado específicamente en adipocitos mediante recombinación homóloga (ratón PGC1 α -FAT-KO). A pesar del reconocido papel de PGC-1 α en la regulación de la biogénesis mitocondrial, no se observaron cambios en la expresión de genes mitocondriales o el contenido en DNA mitocondrial (mtDNA) en el TAB de ratones PGC-1 α -FAT-KO. El tratamiento con rosiglitazona indujo en animales salvajes (Wt) un incremento de la expresión de PGC-1 α , acompañado por un aumento de la expresión de genes mitocondriales, de mtDNA y de la actividad citrato sintasa. Sorprendentemente, a pesar de la falta de PGC-1 α en ratones PGC1 α -FAT-KO, el efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de genes mitocondriales y la actividad mitocondrial fue similar al observado en animales Wt. Sin embargo, la ausencia de PGC-1 α previno la expresión inducida por rosiglitazona de marcadores de adipocito marrón (p. ej., UCPI). Estos resultados sugieren que la ausencia de PGC-1 α en TAB no es suficiente para inducir disfunción mitocondrial y resistencia a insulina, pero es imprescindible para la expresión de UCPI y el reclutamiento de adipocitos marrones en TAB en respuesta a rosiglitazona.

P02r-3

Interacción de la quinasa VRK1 con GARS y sus implicaciones neurológicas

Marta Sanz-García, Lara Cantarero y Pedro A. Lazo

Lazo

Centro de Investigación del Cáncer. CSIC-
Universidad de Salamanca, Salamanca

La quinasa humana VRK1 es una serina-treonina quinasa que se ha estudiado fundamentalmente en el contexto oncológico. Hemos realizado un estudio para identificar posibles reguladores de VRK1 mediante técnicas proteómicas que detectan interacciones proteína-proteína. Entre las proteínas identificadas se encuentra GARS (glicil-tRNA sintetasa). Mutaciones de GARS están asociadas a ataxia y Charcot-Marie-Tooth, una neuropatía periférica. Por otra parte recientemente se ha identificado una mutación de VRK1, R358X, que causa una degeneración pontocerebellar con problemas de coordinación motora. Hemos estudiado las interacciones entre VRK1 y GARS, utilizando tanto las formas silvestres como las mutadas de ambas proteínas. La proteína VRK1(R358X) tiene la mutación en su señal de localización nuclear, localizándose de este modo en el citosol y no en el núcleo como ocurre con la VRK1 *wild type*. El mutante VRK1(R358X) es menos activo como quinasa que el *wild type*, pero ambos tienen la misma especificidad de sustratos. GARS silvestre interacciona en ensayos de pull-down in vitro con ambas VRK1 (wt y R358X). En la célula, GARS solo colocaliza con VRK1(R358X), ya que ambas se encuentran en el citosol. Las formas mutadas de GARS también interaccionan con VRK1 wt, y además lo hacen en mayor grado que GARS wt, por lo que las formas mutantes podrían contribuir a una retención citosólica de VRK1 wt. VRK1 es un gen candidato en enfermos con ataxia o Charcot-Marie-Tooth en las cuales GARS no está mutado.

P02r-4

Los gránulos ácidos de mastocitos contienen polisfosfato inorgánico (polyP) y son similares a acidocalcisomas y gránulos densos de plaquetas

David Moreno-Sánchez¹, Laura Hernández-Ruiz¹, Roberto Docampo² y Félix A. Ruiz¹

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz; Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz, Cádiz, ²Department of Cellular Biology and Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, GA (USA)

Los mastocitos son células de larga vida, presentes en tejidos vasculares de vertebrados, que están asociados a condiciones patológicas tales como asma, alergia y anafilaxis. Juegan un papel clave en la inflamación y en la respuesta inmune adaptativa. El citoplasma de los mastocitos está lleno de gránulos densos metacromáticos con diversos moduladores que son secretados cuando dicha célula se activa. Para comprobar la existencia de polyP, se midió por marcaje fluorescente (DAPI) el polyP en la línea celular RBL-2H3 cuando se sensibilizaba y se activaba la célula, observando un descenso en la fluorescencia al activarse. Se aislaron los gránulos de mastocitos y se cuantificó la concentración de polyP en las distintas fracciones, encontrándose enriquecimiento en los gránulos con membrana. Igualmente se encontró una ganancia de la enzima β -hexosaminidasa, presente en los gránulos secretados en la activación, en dicha fracción. Para confirmar la presencia de gránulos ácidos y con contenido en polyP en la célula, se llevó a cabo inmunofluorescencia con naranja de acridina, DAPI y PPBD (*Polyphosphate Binding Domain*) en células completas. Los gránulos ácidos de mastocitos son ricos en calcio, teniendo características similares a acidocalcisomas y gránulos densos de plaquetas. Mediante fluorimetría y ensayo con scPPX, se encontró una relación entre alcalinización, liberación de calcio e hidrólisis de polyP en los gránulos ácidos. Podemos determinar que los mastocitos contienen polyP en gránulos ácidos, que son liberados cuando son activados.

Nota: Financiación: Ministerio de Ciencia e Innovación (FIS/PI10/01222); Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (P07-CTS-02765) Junta de Andalucía; y Consejería de Salud (PI-0257/09) Junta de Andalucía.

P02-5

Papel de la integrina α IIb β 3-L718P en la señalización *outside-in* y formación de plaquetas

Juan Quintana Alcalá, Gracia Porras y Consuelo González-Manchón

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC),
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII,
Madrid

Observaciones de nuestro grupo y de otros autores apoyan la hipótesis de que la señalización *outside-in* desencadenada por la fijación de fibrinógeno a la integrina α IIb β 3 participa en el proceso de formación de las plaquetas. Recientemente, hemos identificado la mutación L718P en la región citosólica de β 3 asociada a fenotipo hemorrágico severo y disminución del número de plaquetas. El estudio funcional con transfectantes estables indica que la integrina mutante está constitutivamente activada y que causa la disfunción plaquetaria a través de un mecanismo dominante

que implica *clustering* del receptor, alteración de la distribución de los lípidos de membrana, y perturbación de la señalización *outside-in* de la integrina. Hemos analizado la interacción de α Ib β 3-P718 con proteínas intracelulares durante el *clustering* mediante un procedimiento *in situ*, ensayo de ligación por proximidad (PLA), y los resultados sugieren que la interacción con la quinasa Src está aumentada. Sin embargo, aunque la extensión de las células que expresan la integrina mutante es más sensible a la inhibición de Src, dicha inhibición no afecta el *clustering*. Por otra parte, las células que expresan α Ib β 3-P718 adoptan un fenotipo peculiar con largas prolongaciones cuando se extienden sobre fibrinógeno y tienen mayor capacidad de adhesión en condiciones de flujo. Además, la apoptosis inducida por la limitación de nutrientes está significativamente retrasada en estas células, y esta diferencia con las células control se acentúa de forma importante cuando se inhibe la ruta PI3K/Akt. Creemos que la mayor adhesión y supervivencia inducidas por la integrina mutante podría traducirse en el megacariocito en un retraso de su maduración con la consiguiente reducción del número de plaquetas.

P02-6

Identificación de mutaciones en el gen *ABCB4*/MDR3 y efecto sobre la localización subcelular de la proteína

Raquel Gordo-Gilart¹, Sara Andueza¹, Pilar Martínez-Fernández¹, Loreto Hierro², Paloma Jara² y Luis Alvarez¹

¹Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ, Madrid, ²Servicio de Hepatología Pediátrica Hospital Universitario La Paz, Madrid

MDR3 (*multidrug resistance protein 3*) es una fopasa responsable de la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la externa de la membrana canalicular (apical) del hepatocito. Mutaciones en el gen que codifica esta proteína (*ABCB4*) dan lugar a una serie de patologías hepáticas de distinta gravedad. Se ha sugerido que la diversidad de fenotipos identificados en los pacientes está determinada por el tipo de mutación y su efecto sobre la presencia o ausencia de la proteína en la membrana canalicular.

En este estudio hemos identificado 13 mutaciones puntuales en niños con deficiencia en MDR3 (*R47Q*, *G68R*, *T82N*, *T175A*, *T201M*, *G228R*, *S320F*, *P352L*, *D459H*, *P479L*, *A934T*, *S978F* y *E1118K*).

Mediante mutagénesis dirigida, se han generado estos 13 mutantes en el vector pReceiver/MDR3. El efecto de cada mutación sobre la localización subcelular de la proteína se

ha analizado mediante transfección en células polarizadas MDCK II.

Se ha observado por microscopía confocal que las mutaciones *G68R*, *G228R*, *A934T* y *S978F* producen la acumulación intracelular de MDR3. Ensayos de colocalización con calnexina han verificado la retención de estas 4 formas mutantes en el retículo endoplásmico. En los mutantes *R47Q*, *T82N*, *T175A*, *T201M*, *S320F*, *P352L* y *E1118K* se ha apreciado una localización normal en membrana apical.

La correlación de estos resultados con los datos clínicos de los pacientes revela que aquellos que portan mutaciones que comprometen el tráfico normal de la proteína hasta la membrana apical presentan un peor pronóstico.

P02e-7

Melatonin modulates aromatase activity and expression in human umbilical endothelial cells

Virginia Álvarez-García, Carlos Martínez-Campa, Alicia González, Carolina Alonso-González y Samuel Cos

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, Santander

Melatonin, the main hormone secreted by the pineal gland, is widely known to reduce the development of endocrine-responsive breast cancers by interacting at different levels with the estrogen signaling pathways. One of the mechanisms through which this occurs is based on the interaction of melatonin with the expression and the activity of several enzymes involved in the biosynthesis of estrogens in peripheral tissues. In human breast cancer cells, melatonin inhibits the expression and activity of aromatase, the enzyme responsible for the conversion of androgens to estrogens. The presence of aromatase on Human Vein Endothelial Cells (HUVEC) point to the fact that endothelial cells may contribute to the tumor growth by producing estrogens. Since HUVEC express both aromatase and melatonin receptor MT1, the aim of the present work was to evaluate the ability of melatonin to regulate the activity and expression of aromatase on endothelial cells thus modulating the local estrogen biosynthesis. In HUVEC cultured with testosterone in estradiol-free media, 1mM melatonin counteracts the testosterone-induced cell proliferation dependent on the local biosynthesis of estrogens from testosterone by the aromatase activity of the cells. Aromatase activity, measured by the tritiated water assay, was also inhibited by 1mM melatonin in HUVEC. The same concentration of melatonin significantly downregulated the expression of aromatase as well as its endothelial specific aromatase promoter region I.7, measured by real-time RT-PCR. We conclude that

melatonin inhibits aromatase activity and expression in HUVEC by regulating gene expression of specific aromatase promoter regions thereby reducing the local production of estrogens.

P02-8

Identificación proteómica de las proteínas ácidas de las fracciones pancreáticas soluble y enriquecida en lisosomas y mitocondrias que varían su expresión en la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína

Violeta García-Hernández, Nancy Sarmiento, Raúl Alonso-Viana, Carmen Sánchez-Bernal, Nieves Pérez, Laura Ferreira, José J. Calvo y Jesús Sánchez-Yagüe

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca

Puede predecirse que las alteraciones de la expresión proteica en la fase temprana de la pancreatitis aguda (PA) serán relevantes para el desarrollo posterior de dicha patología. La PA se indujo en las ratas mediante 2 inyecciones intraperitoneales de 20 mg/kg de ceruleína (Cer) en intervalos de una hora. El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo en el homogenado postnuclear del páncreas, y las proteínas de las fracciones soluble y enriquecida en lisosomas y mitocondrias (L+M) se separaron mediante 2D-PAGE utilizando gradientes de pH de 3-5,6. Las proteínas cuyo nivel de expresión se incrementó más de tres veces en las ratas tratadas con Cer comparadas con las no tratadas, se identificaron mediante análisis de MALDI-TOF-TOF. Los cambios en algunas de las proteínas se corroboraron mediante transferencias de Western. Se comprobó la sobreexpresión de las siguientes proteínas: fracción soluble: carboxipeptidasas A1, A2 y B1, α -1-inhibidor III, alpha-1-macroglobulina, α -1-antitripsina, tiorredoxina-tipo 1, antígeno de rechazo de tumores gp96, peroxirredoxina 2, haptoglobina, serpina B6 y STRAP (proteína asociada a receptor Ser/Thr); fracción L+M: ATP sintasa (subunidad b), quimotripsinógeno B (CTRB1). Por lo tanto, la sobreexpresión de las proteínas solubles ácidas pancreáticas en la fase temprana de la pancreatitis inducida por Cer se relaciona principalmente con la protección del páncreas, con fenómenos de maduración proteica y con la regulación de la cascada de señalización de TGF- β . La sobreexpresión de CTRB1 sugiere la colocalización temprana de enzimas digestivas de gránulos de zimógenos con lisosomas.

Nota: Financiación: FIS-FEDER, PS09/01075; Junta de Castilla y León, SA005A10-2.

P02-9

El polifosfato inorgánico como modulador fisiológico del factor von Willebrand (FvW) y su implicación en la regulación de la hemostasia en la enfermedad von Willebrand (EvW)

Marcela Montilla Rodríguez¹, Laura Hernández-Ruiz¹, Javier Rodríguez-Martorel² y Félix A. Ruiz¹

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz; Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz, Cádiz, ²Servicio de Hematología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz; Servicio e Hematología-Hemoterapia, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

La enfermedad von Willebrand (EvW) es el trastorno hemorrágico hereditario más común en humanos. Se caracteriza por cantidades reducidas o de formas anormales de la proteína factor von Willebrand (FvW), que está involucrada en procesos de adhesión plaquetaria. Estudios previos de nuestro grupo, con pacientes de EvW y sus familiares sanos, han demostrado una correlación entre la cantidad de FvW y los niveles de polifosfato inorgánico (PolyP) en las plaquetas. El polyP es un polímero de fosfato, secretado por las plaquetas activadas, que modula la actividad de varios factores de coagulación de la sangre. Por tanto, en este estudio comprobamos la interacción del polyP con el FvW y examinamos sus características. Se demostró la interacción molecular entre el polyP y el FvW mediante métodos bioquímicos y por resonancia de plasmones, demostrando que el polyP está unido al factor proveniente de plasma y de plaquetas. También demostramos que el polyP puede favorecer a la actividad del factor, ya que la incubación con el enzima exopolifosfatasa disminuye la actividad del factor in vitro. Más aún, la adición exógena de polyP mejora la actividad del FvW en plasmas de pacientes con la EvW. La interacción polyP-FvW ejerce su función en la modulación fisiológica del factor; por lo que podría tener un valor terapéutico potencial como estrategia novedosa para pacientes con la EvW y para otro tipo de patologías relacionadas con este factor.

Nota: Financiación: Ministerio de Ciencia e Innovación (FIS/PI10/01222); Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (P07-CTS-02765) Junta de Andalucía; y Consejería de Salud (PI-0257/09) Junta de Andalucía.

P02-10

Expresión de miocilina, SPARC y HEVIN en plasma y tejidos linfoides

José Daniel Aroca Aguilar¹, Ana Fernández Navarro¹, Miguel Coca-Prados² y Julio Escribano Martínez¹

¹Laboratorio de Genética Molecular Humana, Facultad de Medicina/Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE)-UCLM, Albacete; Cooperative Research Network on Age-Related Ocular Pathology, Visual and Life Quality, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, ²Department of Ophthalmology and Visual Science, Yale University School of Medicine, New Haven, CT (USA); Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO), Oviedo

Miocilina es una glicoproteína extracelular de función desconocida y asociada a diferentes tipos de glaucoma. Miocilina forma homoagregados a través de su región N-terminal en la que se localiza un motivo cremallera de leucinas y heteroagregados a través del dominio globular C-terminal similar a olfactomedina. Las proteínas matricelulares hevin y sparc, reguladoras de la adhesión celular, interactúan con miocilina. El procesamiento proteolítico de miocilina disminuye la afinidad de estas interacciones.

El objetivo de este estudio es analizar la expresión del gen *MYOC* en tejidos no oculares para estudiar su función biológica. Mediante transferencia Western y RT-PCR se analizó la presencia de miocilina, hevin y SPARC, en plasma y tejidos linfoides (bazo y timo) humanos y murinos. El análisis electroforético de plasma humano y de rata mostró un agregado de miocilina de 90 kDa, así como la presencia de hevin, aunque no de SPARC.

Por otra parte, se observaron bandas de miocilina de 90 kDa, 55 kDa y 35 kDa en bazo y timo humano y murino. Estas bandas podrían corresponder a un agregado, el monómero y fragmentos de la proteína respectivamente. Se detectó la transcripción del gen *MYOC* en bazo y timo humano. En todos los tejidos linfoides analizados, excepto en bazo murino, se detectó el mRNA de *HEVIN* y *SPARC*.

Los resultados muestran por primera vez la existencia de miocilina, y de fragmentos resultantes de su procesamiento proteolítico, en plasma y tejidos linfoides humanos y murinos. Estos datos permiten sugerir que miocilina podría desempeñar una función relacionada con el sistema inmune.

P02-11

Danio rerio: un modelo para el estudio de compuestos antiangiogénicos

Melissa García Caballero¹, Manuel Marí Beffa², Miguel Ángel Medina¹ y Ana R. Quesada¹

¹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Unidad 741 de "CIBER de Enfermedades Raras" (CIBERER), Málaga, ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga

El pez cebra o *Danio rerio* es un pez teleosteo de apenas 4 cm de longitud y 2 gramos de peso. Este modelo se está usando en multitud de estudios biomédicos y toxicológicos por la gran cantidad de ventajas que presenta, entre las que se incluyen las siguientes: vertebrado de pequeño tamaño que puede ser manipulado fácilmente en el laboratorio, elevado número de huevos recogidos en cada puesta, gran transparencia del embrión que permite realizar un seguimiento óptico del desarrollo de órganos y tejidos, etc. Además, el modelo permite la obtención de transgénicos que portan el transgén de la proteína verde fluorescente (GFP) en las células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos. En este estudio, se ha evaluado y comparado la actividad antiangiogénica de diversos compuestos inhibidores de la angiogénesis mediante tres ensayos diferentes llevados a cabo en el modelo transgénico de pez cebra *TG(fli1:EGFP)y1*: análisis de la formación de vasos intersegmentales durante el desarrollo del embrión, estudios de regeneración de vasos en la aleta caudal de peces adultos tras su corte y realización de videos de la circulación sanguínea a través de dichos vasos.

Nota: Agradecimientos: PS09/02216 y TRACE PT2008-0145 y PS09/02216 (Ministerio de Ciencia e Innovación de España), Fundación Ramón Areces, and PIE CTS-3759 (Junta de Andalucía). "CIBER de Enfermedades Raras" es una iniciativa del ISCIII (España).

P02r-12

La heparanasa humana 2 experimenta un fuerte descenso de expresión en adenocarcinomas ductales infiltrantes de mama sin alteraciones significativas de la heparanasa 1

Iván Fernández Vega¹, Olivia García², Marta García², Ainara Crespo Superregui³, Aurora Astudillo González¹ y Luis M. Quirós Fernández⁴

¹Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo,

²Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, Oviedo, ³Departamento de Biotecnología, Neiker Tecnalia Arkaute, Vitoria, ⁴Instituto Universitario Central de Asturias, Oviedo

La heparanasa (HPSE) es una endo- β -D-glucuronidasa que hidroliza enlaces concretos dentro de las cadenas de heparán sulfato (HS), originando fragmentos de tamaño comprendido entre 10 y 20 unidades sacarídicas, que presentan múltiples funciones biológicas. Una segunda isoforma ha sido identificada en el ser humano, Hpa2, carente de capacidad hidrolítica pero capaz de unirse firmemente al HS e inhibir la acción de la primera. La expresión de HPSE se ha correlacionado con el potencial angiogénico y metastático tumoral; por el contrario, la de Hpa2 parece presentar propiedades antimetastáticas. HPSE se expresa como dos especies de RNAm, *HPSE 1a* y *HPSE 1b*, de 5 y 1.7 Kb respectivamente. Ambas contienen la misma ORF, si bien una nueva variante truncada obtenida por *splicing* alternativo, T5, ha sido recientemente descrita, presentando características protumorigénicas. Por otra parte, se ha identificado una región de 185 pares de bases en el extremo 3' no codificante del RNA mensajero de HPSE cuya delección le confiere estabilidad al RNA, favoreciendo la regulación de la expresión a nivel de traducción. En el presente trabajo hemos analizado la expresión de las diferentes isoformas de la heparanasa en adenocarcinomas ductales infiltrantes de mama, definiendo dos grupos en función de la presencia o no de metástasis ganglionar axilar. Los estudios se han llevado a cabo empleando técnicas de PCR en tiempo real, hibridaciones *in situ* e inmunohistoquímica (IHQ). No se detectó sobreexpresión significativa de HPSE, apareciendo sobreexpresada sólo en un 20% de los tumores. La forma de RNA mensajero que se transcribe es *HPSE-1a*, estando *HPSE-1b* restringida a un 35% de los pacientes en ambos grupos. Tampoco hay alteraciones significativas en la delección de la región 3' ni en la isoforma T5, si bien algunos pacientes no muestran expresión de esta última en el tejido sano. Sin embargo, los niveles de expresión de Hpa2 experimentan un descenso significativo (entre 45 y 50 veces) en ambos grupos tumorales. La observación se constata tanto a nivel de transcripción de RNA, como detectando la proteína mediante IHQ.

P02e-13

Efectos de bisfenol A sobre los niveles de mRNA del enzima aromatasa en próstata de rata adulta

Beatriz Castro Bohórquez¹, M^a Pilar Sánchez Medina¹, Jesús M. Torres de Pinedo² y Esperanza Ortega Sánchez²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada. Instituto de Neurociencias, Universidad de Granada, Granada

Bisfenol A (BPA), un agente sintético usado en la producción de plásticos, es un potente disruptor endocrino que afecta al desarrollo y funcionamiento de órganos reproductivos en diferentes especies. Los mecanismos de acción del BPA en el desarrollo de enfermedades prostáticas aún no son bien conocidos. Recientes estudios han puesto de manifiesto que un incremento en los niveles de estrógenos estaría implicado en la patogénesis de enfermedades prostáticas, tales como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata. El estradiol es sintetizado a partir de la testosterona por acción del enzima aromatasa. Por todo ello, el objetivo de nuestro estudio fue medir los niveles de mRNA del enzima aromatasa en próstata ventral de rata adulta, expuestas a diferentes dosis de BPA. Los diferentes grupos experimentales recibieron, vía subcutánea, las siguientes dosis de BPA; 25, 50, 300 y 600 μ g/kg por día durante 4 días. Los niveles de mRNA del enzima aromatasa se midieron utilizando una técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados demuestran un aumento significativo de los niveles de mRNA del enzima aromatasa en próstata de rata adulta en todos los grupos experimentales tratados con BPA, en comparación con las ratas controles. No obstante, dicho incremento no presentó una relación dosis-dependiente. En los últimos años estudios epidemiológicos han informado de un aumento en la incidencia de HPB y cáncer de próstata. Nuestros resultados podrían explicar en parte una posible vía de actuación del BPA en el desarrollo de patologías prostáticas a través de la modulación del enzima aromatasa y, por consiguiente, de los niveles intraprostáticos de estrógenos.

P02-14

Zds1-induced phosphorylation of Cdc55 regulates PP2A/Cdc55 activity during mitotic exit

Ines Calabria, Barbara Baro, Jose-Antonio Rodriguez-Rodriguez, Nuria Russiñol y Ethel Queralt

Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet

At anaphase onset, highly active mitotic cyclin-dependent kinase (Cdk) is inactivated to promote exit from mitosis and completion of cytokinesis. The budding yeast Cdc14 phosphatase is a key mitotic regulator that counteracts

cyclin-dependent kinase (Cdk) activity during mitotic exit. Separase, together with Zds1, promotes the down-regulation of PP2A^{Cdc55} in early anaphase, enabling accumulation of phosphorylated forms of Net1 and nucleolar release of Cdc14. However, the mechanism by which Zds1 impinges on PP2A^{Cdc55} activity is not known. Here we show that the C-terminal domain of Zds1, called the *Zds1 C motif*, is required and sufficient for Zds1-induced release of Cdc14, while the N-terminal domain of the protein might be involved in regulating this activity. More interestingly, Zds1 physically interacts with Cdc55, and regulates its localization via the Zds1 C motif. Our results suggest that the activity of PP2A^{Cdc55} cannot be modulated solely through regulation of its localization, and that an additional regulatory step may be required. Strikingly, we demonstrate that Cdc55 is phosphorylated upon Zds1-induced down-regulation of PP2A^{Cdc55}. We have elucidated the mechanism by which Zds1 promotes the down-regulation of the PP2A^{Cdc55} activity. We can conclude that Zds1 exert its biological function as PP2A regulator, by recruiting PP2A^{Cdc55} to the nucleolus and promoting the phosphorylation of the regulatory subunit Cdc55.

P02r-15

Efectos del estrés sobre la señalización inhibitoria en la amígdala de ratones modelo

Ana Rosa Sáez Ibáñez¹, Javier Gilbert Juan², Julio Sanjuan², Juan Nacher² y María Dolores Moltó²

¹Universidad de Valencia, Burjassot, ²Universidad de Valencia. CIBERSAM. INCLIVA, Burjassot

Diversos estudios han apuntado al estrés crónico como uno de los trastornos comunes sufridos por pacientes de diferentes desordenes psiquiátricos, además de ser uno de los factores desencadenantes de enfermedades como la depresión o la ansiedad. Una de las áreas cerebrales más afectadas por el estrés es la amígdala, región encargada, entre otras, de la respuesta emocional. El modelo de estrés crónico en roedores ha sido utilizado durante años para conocer los cambios bioquímicos sufridos por estos animales durante los procesos de estrés. En este trabajo hemos sometido ratones transgénicos a un procedimiento de estrés crónico mediante inmovilización de 1 hora diaria durante 21 días. Estos ratones expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de GAD67, enzima implicado en la ruta del ácido γ -aminobutírico, principal neurotransmisor inhibitorio. Nuestro objetivo es el estudio de la expresión de genes que codifican para diferentes moléculas implicadas en las sinapsis inhibitorias y la

plasticidad estructural y funcional de las mismas; NCAM, St8siaII, St8siaIV, SYN, GAD67, GAD65. Como resultado observamos una disminución en la expresión de los genes *gad67* y *st8siaII*, además de un descenso en la cantidad de moléculas PSA-NCAM, GAD67 y sinaptofisina, sin cambios en la densidad de espinas sinápticas en las interneuronas GAD67-GFP. Este estudio indica que en la amígdala de ratones sometidos a estrés crónico se produce una reducción significativa de marcadores inhibitorios.

Nota: Agradecimientos: Jerome Lejeune Foundation.

P02r-16

La delección del gen de la podocalicina restringida al endotelio vascular produce alteraciones hemostáticas estables

Miguel Pericacho, Inés Sánchez Navas-Parejo, Darío Fernández, Consuelo González Manchón, Roberto Parrilla y Matilde Sánchez Ayuso
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC),
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII,
Madrid

La podocalicina (Podxl) es una proteína de la familia CD34 que se expresa abundantemente en los podocitos de los glomérulos renales. También se expresa en tejidos extrarenales como células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales vasculares y tumores con alta actividad proliferativa. Trabajos previos de nuestro grupo utilizando ratones con sobreexpresión específica de Podxl en plaquetas, mostraron una disminución del tiempo de sangrado e incremento de la agregación plaquetaria inducida por agonistas (Alonso-Martin et al., 2010), mientras que la delección específica de la Podxl en plaquetas provoca una hemostasia deficiente (en proceso de publicación). La sobreexpresión de Podxl en células CHO produce un incremento en su capacidad para fijar plaquetas inmovilizadas o en suspensión (Larucea et al., 2007). Dada la íntima relación funcional entre plaquetas y endotelio vascular, consideramos de interés explorar el posible efecto de la Podxl de las células endoteliales en el control de la hemostasia. Para ello, hemos generado ratones con delección específica de Podxl en el endotelio vascular, siguiendo la metodología Cre-LoxP de *gene targeting*. Nuestros resultados muestran que la ausencia de Podxl en el endotelio vascular produce un aumento del tiempo de sangrado y retardo en la formación y estabilización de trombos intraarteriales inducidos por cloruro férrico o la infusión por vía intravenosa de colágeno y epinefrina. Además, el aislamiento y purificación de células de endotelio vascular pulmonar de estos ratones y sus controles (*floxed*) nos ha

permitido analizar in vitro el efecto sobre la interacción con plaquetas. Los resultados obtenidos indican que la podocalicina del endotelio vascular desempeña un papel significativo en el control de la hemostasia.

P02r-17

Efecto de la rapamicina en un modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila melanogaster*

Pablo Calap Quintana¹, Jose Vicente Llorens Llorens², Sirena Soriano¹, María Dolores Moltó³ y María José Martínez Sebastián¹

¹Universidad de Valencia, Burjassot (Valencia),

²Universidad de Valencia. Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Burjassot (Valencia), ³Universidad de Valencia. Red en Salud Mental, CIBERSAM. Fundación Investigación Clínico de Valencia, Burjassot (Valencia)

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad neurodegenerativa, causada por la reducción de la proteína frataxina debido a la expansión de repeticiones GAA en el primer intrón del gen *FXN*, lo que provoca la inhibición de su transcripción. Se trata de la ataxia hereditaria más común en la población caucásica.

La frataxina tiene un importante papel en la formación de los centros Fe-S en la mitocondria. Numerosos estudios realizados en diferentes organismos modelo han demostrado que la pérdida de frataxina produce un incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo. Se ha comprobado que el estrés oxidativo da lugar a apoptosis, en cultivo de células de pacientes de AF, aunque no hay evidencias de que esto ocurra in vivo. Por otra parte, hay evidencias de autofagia en neuronas de la raíz de los ganglios dorsales en un modelo de AF en ratón.

Hemos desarrollado un modelo de AF en *Drosophila* basado en técnicas de RNAi y de expresión UAS-GAL4, para reducir la expresión del gen *fh* (*frataxin homolog*) de forma ubicua hasta niveles similares a los de los pacientes, lo que produce individuos con disminución en la longevidad y la capacidad motora y sensibilidad al estrés oxidativo. Otros estudios mostraron que la autofagia inducida por rapamicina aumentaba la longevidad y la resistencia de las moscas tratadas con un inductor del estrés oxidativo. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la rapamicina sobre un modelo de AF en *Drosophila*, observándose un aumento en la supervivencia y la capacidad motora de los individuos, lo que podría indicar que la inducción de la autofagia producida por la rapamicina está protegiendo frente a la muerte celular. Actualmente tratamos de demostrar el papel de la autofagia en la eliminación de las mitocondrias afectadas por el estrés oxidativo.

P02-18

Selección de posibles inhibidores de FABP4: efectos en la inflamación

Aranzazu Isabel Rodríguez Sanz¹, Virginia Martínez², Juan José Vaquero³, Patricia Sanchez⁴, Ramón Alajarin³, María Auxiliadora Bajo², Rafael Selgas², Ana Rodríguez-Marcos¹ y Teresa Bellón¹

¹Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ, Madrid, ²Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ. REDinREN, Madrid, ³Departamento de Química Orgánica, Universidad Alcalá de Henares. REDinREN, Madrid, ⁴Departamento de Química Orgánica, Universidad Alcalá de Henares, Madrid

El tejido adiposo se compone de diversos elementos celulares incluyendo adipocitos, macrófagos y fibroblastos. En casos de obesidad aumenta el número y tamaño de los adipocitos y se produce la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo. Estos macrófagos producen muchas de las moléculas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo como TNF- α que contribuye a la resistencia a la insulina y crea un estado de inflamación crónica de baja intensidad. La proteína de unión a ácidos grasos FABP4/aP2 se expresa tanto en adipocitos como en macrófagos y coordina respuestas metabólicas e inflamatorias. Estudios en ratones deficientes (aP2^{-/-}) demuestran que FABP4 tiene un importante papel en el síndrome metabólico y la regulación de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado tanto in vitro como in vivo que FABP4 puede ser una diana terapéutica en enfermedades como la diabetes tipo 2 y la aterosclerosis ya que un inhibidor de FABP4 mejora estas enfermedades en modelos animales y es capaz de inhibir la producción de citoquinas en monocitos y macrófagos. En este trabajo hemos estudiado la capacidad de 36 compuestos de origen sintético para modular la respuesta proinflamatoria de macrófagos humanos evaluada como producción de TNF- α con un bioensayo diseñado para tal efecto. Los 36 compuestos son derivados del ácido 4-(9-carbazolil)-butanoico que ha sido descrito como inhibidor selectivo de FABP4 (Lehmann et al.2004) así como derivados de b-carbolina y bencimidazol. Encontramos que el compuesto T78d es un buen inhibidor de la producción de TNF- α tanto en la línea THP-1 como en células primarias estimuladas previamente con LPS (IC₅₀=10⁻⁷ M en monocitos).

P02m-19

TWEAK previene la resistencia a la insulina causada por el TNF- α en adipocitos viscerales humanos

Ana Vazquez-Carballo¹, Matilde R. Chacón², Rocio Vila-Bedmar³, Joan Vendrell² y Sonia Fernandez-Veledo²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, ²Hospital Universitario Joan XXIII - IISPV - CIBERDEM, Tarragona, ³Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

La resistencia a la insulina contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2, y la obesidad visceral es un factor de riesgo para su desarrollo. En un estado de obesidad la función endocrina del tejido adiposo se encuentra alterada ya que los adipocitos y/o macrófagos que lo infiltran tienen aumentada la secreción de citoquinas proinflamatorias. Diferentes miembros de la familia del TNF han sido propuestos como posibles responsables de la acción defectuosa de la insulina en tejidos periféricos. El TWEAK (*Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis*) es una citoquina proinflamatoria recién descubierta que podría estar implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas. No obstante, su papel fisiológico en el tejido adiposo no se conoce con exactitud. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar los diferentes efectos del TWEAK frente al TNF- α en adipocitos humanos de origen visceral. Los resultados obtenidos muestran que el TNF- α y el TWEAK activan diferentes rutas de señalización. De hecho, el TNF- α induce resistencia a la insulina por un mecanismo dependiente de JNK1/2, deteriorando la captación de glucosa dependiente de insulina y su señalización a nivel de IRS1 y Akt; efecto que no se observa en presencia de TWEAK. Además, el pretratamiento con TWEAK previene esta activación de JNK1/2, restaurando la señalización de insulina y la captación de glucosa, sin afectar a otros efectos metabólicos del TNF- α . En conclusión, nuestros resultados demuestran que el TWEAK presenta un papel protector frente a la resistencia a la insulina dependiente del TNF- α en los adipocitos humanos viscerales, datos que sugieren que el balance en los miembros de la familia del TNF podría ser clave para el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad.

P02-20

Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency protects against paracetamol-induced hepatotoxicity

Maysa Ahmed Mobasher¹, M. Ángeles Martín², Sonia Ramos², Luis Goya², Jordi Muntané³, Águeda González-Rodríguez⁴ y Ángela M. Valverde⁵

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Madrid, ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC, Madrid, ³Hospital Universitario Reina Sofía. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Córdoba, ⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Madrid, ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Madrid

Acetaminophen (APAP) is an analgesic and antipyretic drug safe at therapeutic doses but its overdose causes liver injury. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a negative regulator of growth factor signalling and modulate the balance between survival and cell death. Our purpose was to study if PTP1B plays a role in APAP-induced hepatotoxicity.

APAP induced hepatotoxicity was evaluated in immortalized hepatocytes from wild-type (PTP1B^{+/+}) and PTP1B^{-/-} mice. PTP1B deficiency protected against GSH depletion, elevation of ROS, cell cycle arrest and apoptotic/necrotic cell death. At the molecular level, phosphorylation of JNK and p38 was higher in APAP-treated wild-type hepatocytes compared to PTP1B^{-/-} cells. Regarding survival signaling, phosphorylation of IGF-IR, levels of IRS1 and IRS2 and activation of Akt decreased in wild-type hepatocytes but not in PTP1B^{-/-} cells. Therefore, the expression of the anti-apoptotic proteins BclxL and Mcl-1 was reduced in wild-type cells, but it was maintained in PTP1B^{-/-} hepatocytes. We confirmed these results in the liver of wild type and PTP1B^{-/-} mice after ip APAP injection. We found increased JNK phosphorylation at 1-6 h post-injection. Survival signaling including phosphorylation of IGF-IR, levels of IRS1 and activation of Akt was decreased at 6 h after APAP injection in wild-type mice, but not in PTP1B^{-/-} mice. GSH depletion and ROS levels were attenuated in PTP1B^{-/-} livers in parallel with an increase in nuclear Nrf2 accumulation and HO-1 induction. Finally, treatment of human hepatocytes with APAP increased PTP1B expression and activation of JNK and p38, decreasing survival signaling and cellular viability. Our

data suggest that PTP1B might be a target against APAP-induced hepatotoxicity.

Note: SAF2009-08114 MCINN.

P02r-21

Evaluación del efecto antiangiogénico del 4-metilumbeliferona

Javier Alejandro García-Vilas García¹, Ana Rodríguez Quesada² y Miguel Ángel Medina Torres²

¹*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga,* ²*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, y CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga*

El ácido hialurónico tiene especial relevancia en los procesos inflamatorios, cicatrización de heridas y en la organización de tejidos. Sin embargo, se ha descrito que altos niveles de ácido hialurónico están asociados con la progresión de la aterosclerosis y favorece la metástasis en tejidos tumorales. El 4-metilumbeliferona ha sido descrito como un agente antitumoral y antimetastático. Junto con las propiedades descritas de este compuesto, quisimos caracterizar si posee capacidad antiangiogénica. Para ello, usamos tanto células endoteliales microvasculares (RF-24) como células endoteliales macrovasculares (HMEC), para llevar a cabo ensayos de migración celular, ensayo de citotoxicidad, diferenciación de tubos sobre matrigel y ensayos zimográficos. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el 4-metilumbeliferona inhibe la proliferación celular, diferenciación de tubos, migración y la adhesión de células endoteliales.

Note: Este trabajo ha sido realizado en parte por PS09/02216 y TRACE PT2008-0145 (Ministerio de Ciencia e Innovación de España), y PIE P08-CTS3759, CVI-6585 y BIO-267 (Gobierno Andaluz). La Unidad 741 del CIBER “de Enfermedades Raras”. El CIBER “de Enfermedades Raras” es una iniciativa del ISCIII.

P02-22

Implicación de acetilcolinesterasa en la apoptosis de células Caco-2 y HT-29, de adenocarcinoma de colon humano

Amaia Talavera Gutiérrez, Laura Campillo Riquelme, María Fernanda Montenegro, Cecilio J. Vidal, Encarnación Muñoz-Delgado y Francisco Javier Campoy

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia, Murcia

Las colinesterasas hidrolizan la acetilcolina, y además realizan acciones no catalíticas, de modo que acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) tienen un papel en la morfogénesis, hematopoyesis, apoptosis, y probablemente en la tumorigénesis. Los cambios en la expresión de AChE y BuChE que hemos observado en tumores neurales y no neurales nos han llevado a estudiar los cambios en las ChE durante la apoptosis en células de cáncer de colon humano (Caco-2 y HT-29), y a explorar el papel de estas enzimas en la proliferación y apoptosis de las células intestinales, manipulando sus niveles con siRNA.

Hemos comprobado que la actividad AChE es baja en las células Caco-2 y apenas detectable en las HT-29; no detectándose actividad BuChE en estas líneas. En las células Caco-2 hay dímeros (formas G2) y monómeros (G1) de AChE. El mRNA de AChE mayoritario en Caco-2 es el de tipo H, que coexiste con niveles 4 veces menores de mRNA AChE-T y AChE-R. El mRNA de BuChE es muy escaso. En las HT-29 predomina el mensajero AChE-R, y también aparecen los mRNA AChE-H y AChE-T. La transfección de Caco-2 con AChE-siRNA, aunque eliminó la mayor parte de la AChE, no tuvo un efecto apreciable sobre la supervivencia de estas células.

El tratamiento con etopósido, un inhibidor de topoisomerasa II, indujo la apoptosis en células Caco-2 y HT-29. En células Caco-2, el silenciamiento de AChE mediante siRNA no afectó a la inducción de apoptosis con etopósido, al menos si se mide por la liberación de fragmentos de DNA al citoplasma, ni al efecto de este agente sobre la viabilidad celular. En las células HT-29, el etopósido indujo un gran aumento en la expresión de los mRNA AChE-H y AChE-T.

Note: Esta investigación está financiada por la Fundación Séneca (CARM; Proyecto 08648/PI/08).

P02r-23

A duplicated sequence in the POMGNT1 gene promoter causes its transcriptional repression in limb-girdle muscular dystrophy type 2O

Madalina Raducu¹, Oihane Fano¹, Belén García¹, Marcos Rubio¹, Adriana Izquierdo², Oscar de Luis², Horacio Zimman³, Rudy Van Coster⁴, Jonathan Baets⁵, Antonio Coloma², Jose Martín Nieto⁶ y Jesús Cruces¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UAM-CSIC, Madrid, ²Dpto. Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, ³Servicio de Neurocirugía, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, ⁴Department of Pediatrics, Division of Pediatric Neurology and Metabolism, University Hospital Ghent, Ghent (Belgium),

⁵Department of Molecular Genetics, Neurogenetics Group, University of Antwerp, Antwerp (Belgium),

⁶Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante

Limb-girdle muscular dystrophy type 2O (LGMD2O) belongs to a group of rare muscular dystrophies named dystroglycanopathies, which are molecularly characterized by hypoglycosylation of α -dystroglycan and present a wide clinical spectrum ranging from congenital muscular dystrophy associated with severe brain and eye malformation to mild forms of muscle weakness with later onset and without brain involvement. We report the first mutation in the promoter region of POMGNT1 gene in a LGMD2O patient, consisting in a 9-bp duplication in homozygous state. By analyzing the downstream effects of this alteration we found a decreased expression of POMGNT1 mRNA and protein in our patient due to a negative regulation exerted by ZFN202 transcription factor. By functional analysis of a series of deletion constructs we localized the proximal promoter region between -402 and +644 bp relative to the transcription start site and found a 75% decrease of luciferase activity of the construct carrying the new mutation compared with the wild type construct. Electrophoretic mobility shift assay revealed that this region contains three Sp1, one Ets1 and one GATA transcription factor binding sites. The three Sp1 sites were confirmed by chromatin immunoprecipitation assay. Surprisingly, the reported mutation generated an additional ZNF202 binding site and caused a strong binding of this transcriptional repressor to the mutated POMGNT1 promoter, whereas it did not recognize the wild type promoter. These studies underline the importance of the promoter regions for adequate gene expression and the association of certain types of dystroglycanopathies with the impairment of yet-unknown regulatory mechanisms.

Note: Funding: Instituto de Salud Carlos III PI09/0343 (J.C) and PI09/1623 (J.M.N).

P02e-24

Estudio de la función y dinámica mitocondrial en respuesta al 17 β -estradiol en las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos MCF-7

Jorge Sastre-Serra, Mercedes Nadal-Serrano, Daniel Gabriel Pons, Jordi Oliver Oliver y Pilar Roca Salom

Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Institut Universitari Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca

La dinámica mitocondrial, fusión y fisión, mantienen la integridad y función de las mitocondrias, siendo importante su estudio en el cáncer. El efecto de los estrógenos sobre la fusión y fisión en el cáncer de mama no ha sido estudiado. El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto del 17 β -estradiol (E2) sobre los genes de la fusión y fisión mitocondriales, así como sobre la proliferación y función de estas mitocondrias. Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF7 sensible a los estrógenos (ER α positivas). Las células crecieron en DMEM Charcoal-Stripped FBS y se trataron con E2 1nM y ICI 182,780 100nM, fármaco que provoca la degradación de ER α . Se estudiaron los niveles de mRNA de proteínas de fusión mfn1-2 y opa1, y de fisión drp1 y fis1 y la cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA) mediante PCR en tiempo real, la cantidad de cardioplipina mediante la NAO y los niveles de Citocromo C Oxidasa (COX) por Western Blot. La expresión de los genes de fusión aumentó significativamente a las 4h de tratamiento con E2, así como la expresión de drp1, que interviene en la fisión. Sin embargo, fis1, factor importante de la fisión, disminuyó significativamente. Todos estos efectos no se observaron en las células pretratadas con ICI 182,780, excepto la mfn1, atribuyéndose por tanto los efectos del E2 a su acción a través de ER α . El mtDNA aumentó a las 24h de tratamiento mientras que la NAO no varió. Los niveles de proteína COX disminuyeron a las 24h de tratamiento. Estos resultados sugieren que E2 a través de ER α provoca un aumento de la proliferación mitocondrial que no va acompañado de un aumento de la función, afectando también a la dinámica mitocondrial (fusión-fisión).

P02-25

Inmunolocalización en la retina humana de POMT1 y POMT2, dos O-manosil transferasas de proteínas asociadas al síndrome de Walker-Warburg

Laura Campello¹, Laura Fernández Sánchez¹, Adriana Izquierdo², Madalina Raducu³, Jesús Cruces³, Nicolás Cuenca¹ y José Martín Nieto¹

¹Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología.

Universidad de Alicante, Alicante, ²Dpto. Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid, ³Dpto. Bioquímica, UAM-Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid

Las distroglicanopatías son un grupo de distrofias musculares recesivas raras que afectan con mayor o menor gravedad al músculo, ojo y cerebro. Se caracterizan por una hipoglicosilación del α -distroglicano (α -DG), una proteína implicada en el anclaje celular a la lámina basal y el establecimiento de sinapsis en el SNC. La más severa es el síndrome de Walker-Warburg, que conlleva graves defectos cerebrales y oculares y está causado principalmente por mutaciones en el gen *POMT1*, y con menor frecuencia en *POMT2*. Estos genes codifican las proteína O-manosil transferasas-1 y -2 responsables de glicosilar el α -DG. Hasta la fecha no se ha estudiado su expresión en la retina de mamíferos adultos. En este trabajo describimos que el gen *POMT1* se expresa a nivel de mRNA y proteína en la retina adulta de todos los mamíferos estudiados, desde roedores hasta la especie humana. Hemos detectado asimismo diversas isoformas putativas de *POMT1*. También hemos investigado el patrón de inmunolocalización de *POMT1* y *POMT2* en los distintos tipos neuronales y gliales de la retina humana. Hemos determinado que ambas proteínas se colocan en las células gliales de Müller. *POMT1* y *POMT2* también se observan en fotorreceptores (segmentos externos e internos), así como en algunas células bipolares, amacrinas y ganglionares. Dado el amplio patrón de expresión de *POMT1* y *POMT2*, proponemos que estas proteínas podrían desempeñar otras funciones en la retina adulta humana adicionales a su papel descrito en la O-glicosilación del α -DG.

Nota: Financiación: Instituto de Salud Carlos III PI09/1623 (J.M.N.) y PI09/0343 (J.C.).

P02-26

Hyaluronic acid is a mediator of mononuclear cell adhesion and cytokine production in porcine cells

Jennifer Cabrera, Albert Gris, Anna Bassols y María José Docampo

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Hyaluronic acid (HA) is a major component of the extracellular matrix that has an essential role in many physiological and pathological processes, including inflammation and regulation of the immune response, in which its action depends upon its molecular size. Many inflammatory conditions are characterized by a HA-rich matrix deposition together with inflammatory cell infiltration. In different cell types *in vitro*, viral infections, pro-inflammatory stimuli or ER stressors induce the formation of macromolecular HA pericellular structures that are adhesive for leukocyte adhesion. On the other hand, low molecular weight fragments of HA have been shown to elicit pro-inflammatory and immune responses. In the present study, we have investigated the effect of the viral mimetic poly(I:C) in two porcine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I), which produce very low levels of HA in basal conditions. In IPI-2I (but not IPEC-J2) cells, treatment with poly(I:C) induced the formation of a thicker pericellular HA matrix. Adhesion of porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to these cells was higher than to control cells. PBMC adhesion on poly(I:C) treated IPI-2I cells was dependent on HA, as the increase in adhesion was abolished by hyaluronidase digestion of the cultures. Adhesion of PBMCs to IPEC-J2 cells was much lower, according to their HA production. Besides this, we tested the ability of small fragments of HA to induce inflammatory responses in porcine PBMCs. Our results show that treatment of PBMCs with low molecular weight HA (100-150 kDa) clearly stimulated the release of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. These results indicate that HA may be a mediator of inflammatory processes in pathological conditions in pigs.

P02-27

Expresión temprana de genes implicados en el proceso de formación de placas de proteína amiloide en hipocampo de ratones dobles transgénicos APP/PS1

Jaume Folch¹, Ignacio Pedrós², Francesc Sureda³, Carlos Beas⁴, Antoni Camins⁵ y Felix Junyent¹

¹Unidad Bioquímica, FMCS, Universidad Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, ²Universidad Rovira Virgili, Reus, Tarragona, ³Unidad Farmacología, FMCS, Universidad Rovira Virgili, Reus, Tarragona, ⁴Universidad Guadalajara, Guadalajara (México), ⁵Universidad de Barcelona, Barcelona

En el presente estudio se analizó la actividad transcripcional en hipocampo de ratones dobles transgénicos APP/PS1, considerados modelo de la AD, a edades tempranas de 3 y 6 meses que es el momento previo a la aparición de déficits cognitivos, y frente a ratones control. Para ello se utilizó un array generado a partir de una librería de veintidós mil oligos (*65-mer mouse oligos, Sigma-Genosys*).

Resultados: Un total de 238 genes mostraron estar expresados de forma diferencial en el hipocampo de ratones APP/PS1 ($z\text{-score} > 2$), por duplicado y a partir de dos experimentos independientes. De entre éstos, 161 corresponden a genes anotados y bien identificados y de los que un total de 26 se han relacionado con la progresión de la enfermedad de AD, de acuerdo con la bibliografía disponible. El análisis de agrupaciones funcionales, *clusters*, muestra que éstos genes están implicados en procesos de neurogénesis, interacciones de membrana, señalización celular, y captación de iones.

Conclusiones: Los resultados obtenidos a partir de un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, ratones APP/PS1 de 3 y 6 meses de edad, muestran la expresión temprana de genes implicados en la formación de las placas amiloides, pero también genes implicados en procesos de diferenciación celular, señalización e interacciones de membrana.

P02-28

Caracterización molecular de la inhibición de EGFR en células de glioma: evaluación del papel de las Rho GTPasas y análisis de la cooperación con temozolomida

Guillem Ramis¹, Elena Thomàs-Moyà¹, Silvia Fernández de Mattos¹, José Rodríguez² y Priam Villalonga¹

¹Grupo de Biología Celular del Cáncer. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS). Universitat de les Illes Balears, Palma,

²Hospital Severo Ochoa, Madrid

La activación del EGFR es una característica distintiva del glioma. Los inhibidores de EGFR, tales como erlotinib (Tarceva), han mostrado actividad en un subgrupo de pacientes de este tipo tumoral. En este estudio hemos

utilizado un panel de líneas celulares de Glioma para avanzar en la caracterización de los efectos de la inhibición de EGFR con erlotinib. Los ensayos de crecimiento celular y de dosis-respuesta indican que erlotinib reduce la proliferación en todas las líneas celulares testadas, sin inducir efectos citotóxicos. Análisis mediante citometría de flujo confirman que la inhibición de EGFR no induce apoptosis, sino arresto del ciclo celular en G1. Erlotinib también impide la formación de esferoides tumorales multicelulares en células U87 y coopera con concentraciones subóptimas de temozolomida (TMZ) reduciendo el crecimiento de dichos esferoides. Esta cooperación es dependiente del orden del tratamiento, ya que el pre-tratamiento con erlotinib protege frente a citotoxicidad inducida por TMZ mientras que el tratamiento concomitante resulta en un efecto cooperativo. El efecto antiproliferativo de erlotinib no está relacionado con el nivel de expresión de EGFR. Sin embargo, correlaciona con la inhibición de la activación de ERK y Akt, conduciendo a la inhibición de la expresión de la ciclina D1, el incremento de los niveles de p27kip1 y la hipofosforilación de pRB. Dada la relevancia de la invasión celular en este tipo tumoral, también investigamos los efectos de Erlotinib sobre la morfología y motilidad celular. Nuestros resultados indican que la inhibición de EGFR altera la señalización mediada por las Rho GTPasas induciendo la formación de fibras de estrés e inhibiendo la motilidad e invasión de células de glioma de forma dependiente de la actividad Rho/ROCK.

P02-29

Mecanismos de la activación de los receptores TLR4 y TLR2 por el etanol en células microgliales

Sara Fernandez-Lizarbe, Jorge Montesinos Selfa y Consuelo Guerri Sirera

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia

Las células microgliales son las responsables de la respuesta inmune en el sistema nervioso. La estimulación de la microglía por varios ligandos de los receptores TLR conlleva a la producción de mediadores inflamatorios y daño neural, participando en ciertas enfermedades neurodegenerativas. Hemos demostrado que el alcohol, a través de los receptores TLR4, activa a la microglía desencadenando un proceso neuroinflamatorio y daño cerebral. El objetivo de este estudio ha sido investigar el mecanismo molecular de la activación de los receptores TLR4 por el etanol, así como evaluar la participación de otros miembros de esta familia de receptores, en particular el TLR2, que ha sido implicado en procesos neurodegenerativos. Demostramos que el etanol, a dosis

moderadas (25-50 mM), aumenta los niveles del TLR4 y del TLR2 en células de microglía en cultivo primario. El etanol induce un reclutamiento de estos receptores y de moléculas asociadas a su señalización hacia los *lipid rafts*, actuando de la misma forma que sus ligandos LPS y LTA. El tratamiento de la microglía con filipina, inhibidor de los *lipid rafts*, impide el reclutamiento y activación de ambos receptores, confirmando la implicación de estos microdominios en la activación de estos receptores. Resultados mediante inmunoprecipitación y microscopía confocal demuestran que el etanol induce una asociación física entre estos dos receptores que podrían estar actuando formando heterodímeros. En conclusión, nuestros datos sugieren que la activación de los TLR por el etanol se produce a través de los *lipid rafts* y la asociación entre receptores TLR podría potenciar los mecanismos de neurodegeneración inducidos por el consumo de alcohol.

Nota: Financiado por SAF2009-07503.

P02-30

SSAO/VAP-1 involvement in beta amyloid aggregation on the vascular wall

Montse Solé y Mercedes Unzeta

Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

The multifunctional enzyme semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 (SSAO/VAP-1) has been found increased in blood plasma and in cerebrovascular tissue of Alzheimer's disease (AD) patients, colocalizing with beta amyloid (A β) vascular deposits. This enzyme, through the metabolism of primary amines, generates hydrogen peroxide and aldehyde products that contribute to the oxidative stress, advanced glycation end product generation, and A β aggregation. Moreover, as a vascular adhesion protein, it participates in the inflammatory leukocyte recruitment. The particular mechanisms existing between A β deposits and SSAO upregulation have not been established. Therefore, the aim of this work is to study a possible role of SSAO/VAP-1 in the A β accumulation on the cerebrovascular wall, present in most AD cases and known as cerebral amyloid angiopathy (CAA).

As *in vitro* CAA model, we have used endothelial cell lines overexpressing or not the human SSAO/VAP-1 protein treated with the Dutch mutated A β peptide. A β aggregation states have been analyzed by thioflavin-T fluorescence assay, and western blotting of total or fractionated A β forms. Results showed an increase of A β deposition on cell cultures expressing SSAO/VAP-1, which was even higher after addition of methylamine as SSAO substrate.

Moreover, A β oligomeric forms were more abundant in SSAO/VAP-1 expressing cells, correlating with the cell damage induced by A β treatment. Our results show that SSAO is able to modify the A β aggregation through both SSAO activity-dependent and independent mechanisms; therefore, it demonstrates that SSAO could be involved in the A β accumulation on vessel walls and vascular damage underlying CAA and AD progression.

P02-31

Aumentos de la actividad angiotensinasa en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

Itxaro Perez Urzelai¹, Francisco Santaolalla Montoya², Aitor Zabala López de Maturana², Maider Beitia San Vicente¹, Peio Errarte Yarza¹, Eneko Eguzkizaga Zamarripa¹, Begoña Sanz Echevarría¹ y Lorena Blanco Criado¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU, Bilbao, ²Servicio de Otorrinolaringología, Hospital de Basurto, Bilbao

El carcinoma epidermoide o escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) es el de mayor frecuencia en esta localización (90%) y es de gran relevancia por su relación directa con el consumo de tabaco y por su alta capacidad para producir metástasis. En los últimos años se han publicado muchos trabajos sobre la implicación de las proteasas en su crecimiento y diseminación. La aminopeptidasa A (APA) y la aspartil aminopeptidasa (ASP-AP) son dos enzimas que regulan la actividad de la angiotensina II, conocido péptido vasoactivo del sistema renina-angiotensina (SRA). La acción de estas peptidasas y de la propia angiotensina II ha sido relacionada con el inicio, progresión y diseminación a distancia de algunas neoplasias. Sin embargo poco se sabe sobre su implicación en el HNSCC. Con el fin de conocer mejor el comportamiento de la APA y la ASP-AP en el HNSCC, se analizó su actividad en 22 muestras tumorales (tejido seleccionado y diagnosticado en el Hospital de Basurto). Tras un proceso de preparación del tejido fresco, la actividad enzimática se midió mediante fluorimetría [actividad expresada en unidades de peptidasa por miligramo de proteína en el tejido (UP/mg prot)]. Se comparó la actividad del tejido tumoral (T) frente al tejido normal adyacente (N) (datos analizados mediante T Student). En los resultados se observó un aumento significativo de la actividad de ambas peptidasas en el tejido tumoral (APA: T = 1483 \pm 202 vs N = 706 \pm 114 UP/mg prot; ASP-AP: T = 194 \pm 17 vs N = 144 \pm 16 UP/mg prot. $p < 0.01$ en ambos casos). Estos resultados sugieren la implicación de las angiotensinas (APA y ASP-AP) y, posiblemente, del SRA en el HNSCC.

P02-32

GBM response to therapy monitored by MRI and MRSI

Teresa Delgado-Goñi¹, Juana Martín-Sitjar¹, Milena Acosta², Silvia Lope-Piedrafita³ y Carles Arús¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès,

²Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Universitat Autònoma de Barcelona,

Cerdanyola del Vallès, ³Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Temozolomide (TMZ) is an alkylating agent used for glioblastoma (GBM) treatment. It is commonly diluted for preclinical studies in dimethyl sulfoxide (DMSO) which has been reported to cross the blood-brain-barrier and to produce contrast between GL261 mouse GBM and peritumoral brain parenchyma in magnetic resonance (MR) studies [1,2].

Our purpose was to evaluate mouse GBM response to TMZ by MR Imaging (MRI) and Perturbation Enhanced MR Spectroscopic Imaging (PE-MRSI).

C57BL/6 female mice (n=27) were inoculated with GL261 mouse glioma cells as in [3]. MR studies were carried out at 7T, with isoflurane anesthesia (1.5-2.0 %) and at 37°C. TMZ was administered orally to 21 mice in 3 cycles (5 days, 2 days and 2 days respectively). Six animals were used as controls. High resolution T_{2w} MRI images were acquired before and during treatment for tumour volume measurement. Nine treated mice were studied by PE-MRSI with DMSO intraperitoneal injection before treatment and after cycles 1 and 2. Data were post-processed with 3DiCSI [3] and MatLab.

Tumour growth rate significantly slowed down after the second TMZ cycle (p<0.05), remained stable for 4 days and recurred after the third cycle. The animals studied by PE-MRSI during the constant volume response period showed 4-fold lower DMSO accumulation compared to untreated control mice.

TMZ produces a transient response in GL261 tumours which can be monitored by T_{2w} MRI as volume growth arrest. MRSI-detection of differential DMSO accumulation in those tumours provides a biomarker of this response: DMSO strongly accumulates inside untreated tumours compared to TMZ-treated mice.

[1] Delgado-Goñi *et al.* ESMRMB, Antalya, Turkey, 2009; 271.

[2] Delgado-Goñi *et al.* ISMRM, Stockholm, Sweden, 2010; 3495.

[3] Simões *et al.* *NMR Biomed* 2010; 23: 23-33.

P02-33

Assessment of the biochemical changes observed using magnetic resonance spectroscopy in brain in a rat model of stroke

Elena Jiménez-Xarrié¹, Joan Martí-Fàbregas¹, Raquel Delgado-Mederos¹, Silvia Lope-Piedrafita², Ana Paula Candiota³ y Carles Arús³

¹Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona,

²Servei de Resonància Magnètica Nuclear,

Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ³Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Magnetic resonance spectroscopy (MRS), either using single or multivolume approaches, is a very useful non-invasive technique to assess biochemical information in living organisms. Stroke is a complex disease causing changes in brain metabolic profile due to the ischemic process. Several studies have focused in the stroke core but we also expect to obtain useful information from the adjacent zone. Our study aims to identify early and late biomarkers after the ischemic onset and to understand how this pathological state affects the brain as a whole in a rat model of stroke.

Sprague-Dawley rats (n=5) were subjected to 90-minute transient right middle cerebral artery occlusion. MRS data were collected at 7 Tesla at 3 time points: before (pre-ischemia), 24 hours and 7 days after ischemia onset. Infarct location and size were assessed by magnetic resonance imaging. Regions of interest comprised tissue adjacent to the infarct and the contralateral region, which was used as control. Peak heights of chosen metabolites in MRS data were used for the analysis. Differences were assessed with the Student's t-test.

The metabolites studied were total choline (3.21 ppm), total creatine (3.03 ppm), N-acetylaspartate (2.01 ppm) mobile lipids (ML1)/lactate (1.30 ppm) and mobile lipids (ML2) (0.90 ppm). Significant changes were observed in the ipsilateral hemisphere (e.g. ML1/lactate), as expected due to the ischemic process, although changes observed in other metabolites could also provide us with relevant information about this pathological state. In summary, we have applied MRS to assess brain metabolome information and to investigate preclinical surrogate biomarkers that could become a diagnostic/prognostic tool with translational potential in clinical practice.

P02r-34

Expresión de la ciclooxigenasa-2 y metilación de islas CpG en el carcinoma hepatocelular

Cristina Llorente Izquierdo¹, Ana Fernández Álvarez², Noelia Agra Andrieu¹, Rafael Mayoral Moñibas³, Marta Casado Pinna⁴ y Paloma Martín Sanz³

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, ²Instituto de Biomedicina de Valencia IBV, Valencia, ³Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, y CIBEREHD, Madrid, ⁴Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), y CIBEREHD, Valencia

La ciclooxigenasa (COX) es el enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de prostanoïdes. Las prostaglandinas juegan un papel importante en numerosos procesos biológicos y patológicos como la inflamación y el cáncer. COX-2 se expresa y se induce por diferentes estímulos en diversos tejidos y tipos celulares, pero en el hepatocito su expresión está limitada a aquellas situaciones fisiopatológicas que conducen a desdiferenciación o proliferación celular. Aunque la expresión de COX-2 se encuentra incrementada en los estados iniciales del carcinoma hepatocelular (CHC), hay una correlación inversa entre expresión de COX-2 y el grado de diferenciación del CHC y resultados preliminares de nuestro grupo han mostrado una expresión del mensajero de COX-2 significativamente más elevada en el tejido hepático adyacente al CHC. Modificaciones epigenéticas del DNA genómico son la base de la regulación de todas las funciones del genoma, incluyendo la expresión génica, replicación del DNA y la estabilidad del genoma. En particular, la metilación de islas CpG se asocia con la supresión de la expresión génica. Con el fin de determinar la implicación de eventos epigenéticos que regulan la expresión de COX-2 en la progresión del cáncer hepático, hemos estudiado la metilación de islas CpG en el gen de COX-2 por pirosecuenciación en diversas líneas celulares de hepatoma y muestras de CHC humano. Los resultados obtenidos permiten un análisis detallado de la correlación entre el estado de metilación de las islas CpG, la expresión del mRNA de COX-2 y la clasificación histológica de CHC.

P02-35

Polimorfismos de los genes *TPA* y *PAI-1* en la osteomielitis

Tania Fontanil López¹, Angel Hugo Montes Hernández¹, Victor Asensi Álvarez² y Eulalia Valle-Garay¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo, Oviedo, ²Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo

La osteomielitis (OM) es una infección de hueso caracterizada por una destrucción inflamatoria progresiva del hueso (*sequestrum*) y formación de hueso nuevo (*involucrum*). La zona del secuestro presenta edema, congestión vascular y trombosis de los vasos sanguíneos. El activador del plasminógeno de tejido (tPA) tiene como función principal la activación del sistema fibrinolítico aunque también está implicado en la respuesta inmune a las infecciones. Variaciones genéticas en los genes *TPA* y su inhibidor (*PAI-1*) podrían estar asociadas con el desarrollo de la osteomielitis. Se extrajo el DNA de muestras de sangre de 500 individuos de raza caucásica (200 enfermos con OM con confirmación clínica, radiológica y microbiológica) y 300 controles sanos del Banco de Sangre del Centro Comunitario de Transfusiones del Principado de Asturias) y se genotiparon dos polimorfismos, Alu I/D del gen *TPA* y 4G/5G del gen *PAI-1*. Se observó que el genotipo I/I del polimorfismo Alu I/D del gen *TPA* y el alelo I eran significativamente más frecuentes en pacientes con OM con respecto a los controles sanos. Por otra parte el genotipo 4G/4G del polimorfismo 4G/5G del gen *PAI-1* era significativamente menos frecuente en los pacientes con OM que en los controles sanos. Los genotipos I/I de *TPA* y 4G/4G de *PAI-1* puede tener un efecto modulador frente al desarrollo de OM.

P02m-36

GAS6 regula la respuesta inflamatoria en modelos murinos de colitis ulcerativa

Cristina Aresté¹, Azucena Salas² y Pablo García de Frutos¹

¹Departamento de Muerte y Proliferación Celular Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, ²IDIBAPS, Barcelona

La proteína GAS6 (*growth arrest specific gene product 6*) pertenece a la familia de proteínas dependientes de vitamina K y actúa como ligando extracelular para los receptores TAM. Los TAM tienen un papel muy importante en el sistema inmune. Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) son afecciones crónicas del intestino resultado de una respuesta inmune anormal a la microbiota intestinal y se tratan de enfermedades multifactoriales. Nuestro objetivo es investigar la posible implicación del sistema GAS6/TAM en IBD. A los ratones *gas6*^{+/+} (WT) y *gas6*^{-/-} (KO) les administramos 2% de sulfato de dextrano (DSS) a través del agua para beber. El

DSS produce una acusada inflamación tisular en el colon de los ratones caracterizada por diarrea, sangrado rectal y acortamiento del colon, similar a la colitis ulcerativa en humanos. Los ratones recibieron agua sola (grupo control) o DSS durante 4 (DSS-4d) y 7 días (DSS-7d); algunos de los DSS-7d se les permitió recuperarse sustituyendo el DSS por agua sola durante 5 días (DSS-R). La pérdida de peso de los DSS-7d fue significativamente mayor en los ratones KO que en los WT. Un 70% de ratones KO DSS-R murieron vs un 8% de ratones WT DSS-R. El mRNA de *gas6* en colon de los ratones WT disminuía progresivamente en los DSS-4d y -7d respecto al grupo control, recuperando su valor en los DSS-R. Los niveles de proteína en plasma, sin embargo, presentaban un patrón opuesto. Los proteínas Axl está más expresada en los ratones KO control que en los WT control y aumenta su expresión con el tratamiento de DSS. Algunas proteínas fosforiladas implicadas en la vía de GAS6/TAM como p-ERK y p-STAT3 se mantienen elevadas solo en los KO DSS-7d y -R. El tandem GAS6/Axl podría ser relevante en la respuesta inmune en colitis ulcerativa.

P02-37

Hacia la caracterización del epítipo del autoantígeno en el síndrome de Goodpasture

Roberto Gozalbo Rovira¹, Jesús Rodríguez Díaz², Juan Saus¹ y Javier Cervera¹

¹Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, ²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Paterna

El síndrome de Goodpasture (GP) es una enfermedad rara de carácter autoinmune que cursa con una glomerulonefritis rápidamente progresiva frecuentemente acompañada de hemorragia pulmonar. El ataque inmunológico se lleva a cabo mediante autoanticuerpos circulantes (anticuerpos GP) dirigidos contra el dominio C-terminal no colagenoso (NC1) de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV, también llamado antígeno de GP. La red de colágeno IV es el esqueleto de la membrana basal glomerular y alveolar y contiene las estructuras atacadas por los anticuerpos GP.

Aquí mostramos la caracterización fina del epítipo del autoantígeno GP (epítipo GP) mediante la utilización de librerías de péptidos tipo *phage display* (NEB) frente a los anticuerpos GP de un paciente. Tras tres rondas de selección (*panning*) utilizando las librerías peptídicas se obtuvo la secuencia de varios clones y su mapeo en el dominio NC1 se determinó mediante el uso de los algoritmos informáticos pepsurf y mimox y de un modelo tridimensional del hexámero $(\alpha 3\alpha 4\alpha 5)_2$ que contiene el epítipo GP. Este modelo se obtuvo utilizando el programa

Modeller usando como molde la estructura del hexámero $((\alpha 1)2\alpha_2)_2$ (PDB # 1T60).

Nuestros resultados indican que la región antigénica es más amplia de la inicialmente caracterizada como epítipo GP y comprende nuevas regiones no identificadas previamente.

Nota: Ayudas: Fundación Ramón Areces, XV Concurso Nacional. R.G.R. es becario FPU del MICINN.

P02e-38

A novel mode of TGF- β signalling through Smad1/Smad5 phosphorylation: mechanism and functional role in cancer

Pedro Vizan, Amanda C. Daly, Rebecca A. Randall y Caroline S. Hill

Laboratory of Developmental Signalling, Cancer Research UK London Research Institute, London (UK)

Transforming growth factor- β (TGF- β) belongs to a superfamily of cytokines that plays an important role in many cellular processes. Importantly, TGF- β is implicated in many human diseases, in particular in cancer. The TGF- β superfamily of ligands regulates gene expression through the Smads, a subset of which, the R-Smads, are specifically phosphorylated by serine/threonine kinases receptor complexes after ligand stimulation. Phosphorylated Smads can form homomeric complexes, or complexes with the co-Smad Smad4, which with other transcription factors regulate the transcription of specific set of genes in the nucleus. The traditional view of these signalling pathways is that members of the BMP and GDF subfamilies of ligands signal through type I receptors ALKs 1, 2, 3 and 6 via the R-Smads, Smad1, Smad5 and Smad8, whilst members of the Activin/Nodal and TGF- β subfamilies signal through ALKs 4, 5 and 7 via Smad2 and Smad3. However, observations in our lab clearly demonstrate that TGF- β induces simultaneous phosphorylation of both Smad1/5 and Smad2/3 in most cell types [1]. We have been addressing and characterizing this novel mode of TGF- β signalling. We postulate that heteromeric receptor complexes comprising both TGF- β and BMP type I receptors are required, and this leads to formation of mixed Smad complexes that comprise Smad1/5 and Smad2/3. We have studied the function of this novel mode of signalling by TGF- β , both at the level of gene regulation, and more broadly in tumorigenesis.

[1] Daly *et al.* *Mol Cell Biol* 2008; 28 (22): 6889-6902.

P02r-39

Las células de mieloma humano contienen niveles significativos de polifosfato inorgánico que están relacionados con la transcripción nucleolar

María Dolores Jiménez-Núñez¹, David Moreno-Sánchez¹, Laura Hernández-Ruiz¹, Alicia Benítez-Roldán², Ana Ramos-Amaya², Beatriz Rodríguez-Bayona², Francisco Medina², José Antonio Brieva² y Félix A. Ruiz¹

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario Puerta del Mar; Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz, Cádiz, ²Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

El mieloma múltiple (MM), segundo cáncer más frecuente de la sangre, se caracteriza por la proliferación de células de mieloma en la médula ósea. El polifosfato inorgánico (polyP) es un polímero que se acumula en los gránulos densos de las plaquetas y que está implicado en la coagulación sanguínea, angiogénesis y apoptosis de células plasmáticas. El nucléolo es una estructura dinámica involucrada en la biogénesis del ribosoma, regulación del ciclo celular y respuesta a estrés. El estudio de localización del polyP mediante microscopía confocal y marcaje con DAPI y PPBD (*polyphosphate binding domain*); y la realización de técnicas de proteómica en fracciones subcelulares de la línea celular de mieloma humano (U266), reveló que el polyP se acumula en el centro fibrilar del nucleolo. Por otro lado, el marcaje DAPI-polyP de las estructuras nucleolares desaparece completamente con scPPX1 y RNAsa, pero no con RNAsa solo. Además, la inhibición de la transcripción nucleolar, mediante el tratamiento con actinomicina D, produce una drástica modificación en la distribución celular del polyP en células U266. Asimismo, la actividad de la enzima RNA polimerasa I, responsable de la transcripción de RNA ribosómico en el nucleolo, es inactivada por polyP de forma dosis dependiente. En conjunto, estos resultados sugieren que el metabolismo del polyP puede afectar a la estabilidad y funcionalidad del nucleolo de las células, desencadenando estados patofisiológicos incluyendo cáncer. Por ello, el polyP nucleolar podría ser considerado como una diana atractiva para el tratamiento del MM.

Nota: Ministerio de Ciencia e Innovación (FIS/PI10/01222); Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (P07-CTS-02765) Junta de Andalucía; Consejería de Salud (PI-0257/09) Junta de Andalucía.

P02-40

La producción de óxido nítrico está aumentada en niños con obesidad severa y se relaciona con marcadores de estrés oxidativo e inflamación

Pilar Codoñer Franch¹, Sandra Tavárez Alonso², Rosa Murria Estal³ y Eulalia Alonso Iglesias²

¹Departamento de Pediatría Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, y Departamento de Pediatría, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, ³Laboratorio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia

El óxido nítrico (NO), el principal factor de relajación derivado del endotelio, es muy sensible a las condiciones de estrés oxidativo como las que se dan en la obesidad. El objetivo del presente estudio ha sido evaluar el metabolismo del NO en niños obesos con diferentes grados de riesgo metabólico (MRF), y su relación con el estrés oxidativo y la inflamación. En el estudio participaron 60 niños obesos (32 < 4 MRF y 28 > 4 MRFs) y 50 niños con normopeso entre 7-14 años. El estatus nutricional se evaluó mediante exámenes clínicos y antropométricos. En todos ellos se analizaron el perfil lipídico, resistencia a la insulina, presión sanguínea, ácido úrico, homocisteína, leptina y marcadores de inflamación. Nitrito, nitrato y nitrotirosina en plasma, y nitrato urinario fueron determinados como marcadores de la producción de NO y de estrés nitrosativo. El estrés oxidativo se evaluó por los niveles plasmáticos de malondialdehído, 8-isoprostano y AOPP. Según nuestros resultados, los indicadores de la síntesis de NO y de estrés oxidativo y nitrosativo se elevan significativamente en la población obesa, y se asocian a la presencia de MRF; el nitrato en plasma con la circunferencia de cintura ($r=0,388$, $p=0,003$), el ácido úrico ($r=0,404$, $p<0,001$) y el TNF ($r=0,302$, $p=0,021$), y el nitrito en plasma con los triglicéridos ($r=0,432$, $p<0,001$). En base a estos resultados sugerimos que la elevación de la síntesis de NO en niños obesos puede ser un evento temprano asociado al estrés oxidativo y la inflamación y que, junto a estos procesos, puede contribuir de forma importante al desarrollo temprano de arteriosclerosis.

Nota: Financiado con las ayudas CONSOLIDER-INGENIO CSD2007-00063 y EVES.

P02-41

Los niveles circulantes de poliaminas están aumentados en niños obesos y se relacionan con marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y angiogénesis

Sandra Tavárez Alonso¹, Pilar Codoñer Franch², Rosa Murria Estal³, Guadalupe Herrera Martín⁴ y Eulalia Alonso Iglesias¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, ²Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, y Departamento de Pediatría, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, ³Laboratorio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, ⁴Laboratorio de Citómica, Unidad Mixta Centro de Investigación Príncipe Felipe-Universidad de Valencia, Valencia

La obesidad infantil predispone a disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular en la edad adulta. Entre los mecanismos implicados están el estrés oxidativo y las alteraciones en la síntesis/disponibilidad del óxido nítrico (NO). Sin embargo, no se ha estudiado la participación en estos procesos de las poliaminas. Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son policationes derivados, al igual que el NO, de la arginina, por lo que alteraciones en su homeostasis pueden afectar la disponibilidad de NO. El presente estudio evalúa los niveles circulantes de poliaminas en una población pediátrica obesa y su relación con diferentes marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo y disfunción endotelial. Se trata de un estudio observacional analítico caso-control realizado sobre 102 niños de 7-14 años (60 obesos, 42 normopeso). Las poliaminas se determinaron mediante HPLC. También se evaluaron los metabolitos del NO, diferentes parámetros de estrés oxidativo/nitrosativo, marcadores inflamatorios, moléculas de adhesión y adipocitoquinas. Nuestros resultados indican que los niveles de poliaminas se elevan significativamente en la población obesa, siendo la espermina la de mayor poder discriminatorio. En la población global, los niveles de espermina se relacionan con los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación, leptina y moléculas de adhesión. Solo en los niños obesos la espermina se correlaciona positivamente con el VEGF (marcador de angiogénesis) y negativamente con la 3'-nitrotirosina (indicador de estrés nitrosativo). Estos datos implican al metabolismo de las poliaminas en las complicaciones de la obesidad, quedando por dilucidar su utilidad potencial como herramienta clínica.

Nota: Financiado con las ayudas CONSOLIDER-INGENIO CSD2007-00063 y EVES.

P02m-42

Reactive oxygen species as modulators of alpha 2,3-sialyltransferase ST3Gal III and sialyl-Lewisx expression in pancreatic adenocarcinoma cell lines

Marta Pérez-Garay¹, Rafael de Llorens¹, Carme de Bolós², Fernando Vidal-Vanaclocha³ y Rosa Peracaula¹

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Girona, Girona, ²Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, ³Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad del País Vasco, Leioa

Several adenocarcinomas overexpress the carbohydrate antigen sialyl-Lewis^x (SLe^x), which is involved in E-Selectin-mediated extravasation during haematogenous metastasis and contributes to a poor prognosis. Alpha 2,3-sialyltransferase ST3Gal III (ST3Gal III) is one of the genes that contributes to the expression of SLe^x and is also correlated with tumour malignancy in several adenocarcinomas. However, how tumour cells regulate ST3Gal III and SLe^x overexpression is not fully understood and is a subject of intense research. Our results show that in the pancreatic adenocarcinoma cell lines Capan-1 and MDAPanc-28, the expression of the SLe^x epitope and ST3Gal III mRNA levels as well as adhesion to E-selectin were induced by cell proliferation and differentiation. In addition, proliferation and differentiation processes were accompanied by a decrease in glutathione (GSH) anti-oxidant levels and the production of reactive oxygen species (ROS). When sparse or confluent cultures were treated with H₂O₂, ROS levels increased along with ST3Gal III and SLe^x levels. Moreover, when cells were pre-treated with N-acetylcysteine, a GSH precursor, ROS production was partially abrogated, and a decrease in ST3Gal III and SLe^x expression was observed. In conclusion, our data suggest that ROS, generated in the Capan-1 and MDAPanc-28 cell lines during cell proliferation and differentiation or by external oxidant stimuli such as H₂O₂, plays a role in the regulation of ST3Gal III and SLe^x levels and the acquisition of a more aggressive phenotype.

P02-43

Expansion and mobilization of hair follicle stem cells promote tumor initiation in mouse skin

Purificación Muñoz Moruno

IDIBELL, Hospitalet de Llobregat

Epidermal keratinocytes and hair follicle stem cells have been associated to the origin of squamous cell carcinomas (SCCs). Here, we determine alterations in the homeostasis and dynamics of hair follicle bulge and hair germ stem cells that are involved in SCC initiation. We used a skin cancer mouse model that expresses, in stem cells and basal keratinocytes, the oncoproteins E6 and E7 from human papillomavirus, which are related to human SCC development. We show that during early steps of tumorigenesis, E6 and E7 induce an aberrant expansion of K15-expressing cells that exhibit hair germ markers. Lineage tracing assays demonstrate that the leucine-rich G protein-coupled receptor 5 (Lgr5)-expressing bulge stem cells and their progeny are the origin of the aberrantly expanded K15+cell population, which is produced by activation of bulge stem cell proliferation and attenuation of the hair follicle differentiation program of their descendants. A large subset of these K15+hair germ-like cells is mobilized to the infundibulum and to the interfollicular epidermis, accumulates at pre-neoplastic lesions and has been identified in oncoprotein-driven tumors. These findings indicate that aberrant accumulation of hair germ-like cells in hair follicles, and their subsequent migration to the interfollicular epidermis, can promote skin tumor initiation.

laboratorio del Dr. de Celis. El elemento P-GS de las líneas EP se caracteriza por tener dos copias de la secuencia promotora de levadura UAS en sus extremos. Así, cuando se combinan en la misma mosca con la proteína Gal4, se activa la transcripción de los genes situados a ambos lados de la inserción. Para realizar el rastreo hemos creado la línea UAS-cytGFP; Dmef2GAL4 lo que permite trasladarla con las líneas EP expresar en todo el mesodermo tanto la proteína GFP como los genes situados cerca de la inserción del P-GS en cuestión. Por observación directa del patrón de expresión de GFP en los embriones resultantes del cruce seleccionamos aquellas inserciones que producían anomalías en los patrones musculares embrionarios o en la capacidad de contracción. De las 600 líneas rastreadas obtuvimos 140 con fenotipos de sobreexpresión en el mesodermo que clasificamos en 8 grupos por sus fenotipos (defectos de fusión, pérdida de unión miotendinosa, ausencias musculares, duplicaciones musculares, defectos morfológicos, defectos de contracción, defectos de patrón, otros). La identificación del gen (es) implicado (s) en la generación del fenotipo de sobreexpresión ha sido facilitada por el mapeo previo de las inserciones de esta colección realizado en el laboratorio del Dr. de Celis [1,2]. En la actualidad estamos analizando los genes candidatos a ser responsables de los fenotipos de sobreexpresión para determinar si se requieren en el mesodermo.

[1] Molnar C, López-Varea A, Hernández R y de Celis JF. *Genetics* 2006; 174: 1635-59.

[2] Cruz C, Glavic A, Casado M, de Celis JF. *Genetics* 2009; 183: 1005-26.

P03. Biología del Desarrollo

P03r-1

Identificación de nuevos genes implicados en la miogénesis de *Drosophila* por rastreos de ganancia de función

Alexandra Atienza Manuel, Marta Carrasco Rando y Mar Ruiz-Gómez

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Para identificar nuevos genes implicados en miogénesis hemos llevado a cabo un rastreo de una colección de 600 nuevas inserciones EP (vector P-GS), generada en el

P03r-2

Papel del complejo SOCIC (*Store-Operated Calcium Influx Complex*) durante la fecundación de oocitos de ratón

Aida M^a López Guerrero¹, Vanessa Casas Rua², Ignacio S. Álvarez², Eulalia Pozo Guisado¹ y Francisco Javier Martín Romero¹

¹Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, ²Dpto. Anatomía Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Badajoz

La señalización mediada por Ca²⁺ es esencial en el oocito de mamíferos ya que las variaciones en la concentración citosólica de este ion controlan numerosos procesos necesarios para la progresión de la transición cigoto-embrión. Esta señalización está especialmente relacionada con la activación de diferentes quinasas que controlan no

solo el propio transporte de Ca^{2+} sino procesos relacionados con el bloqueo meiótico y la evolución del ciclo celular. La descripción de la maquinaria molecular que regula la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) nos ha permitido sugerir la importancia de esta vía de influjo de Ca^{2+} en la señalización intraocitaria durante la fecundación de oocitos de ratón. Además de STIM1, que actúa como sensor de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, y ORAI1, como canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática (canal SOC), nuestros resultados sugieren la participación de TRPC1 en el complejo SOCIC. De entre los canales TRPC detectados en oocitos, el de mayor nivel de expresión es TRPC1. La inmunolocalización de TRPC1 indica que en oocitos de ratón se produce un aumento en la densidad del mismo en la membrana plasmática del oocito durante la maduración oocitaria, y que el grado de colocalización STIM1-ORAI1-TRPC1 aumenta en los estadios iniciales de la fecundación. Además, este complejo se encuentra muy polarizado en el oocito fecundado, sugiriendo que el influjo de Ca^{2+} durante la fecundación también tiene una distribución espacial polarizada. En conclusión, TRPC1 forma parte de un complejo ternario, junto con STIM1 y ORAI1, al que denominamos SOCIC, que podría estar regulando la señalización de Ca^{2+} durante la fecundación.

Nota: Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU-2008-0104) y Junta de Extremadura (GR10125).

P03-3

La caracterización molecular de diferentes alelos *dachsous* indica una función esencial de la región citoplasmática en todos los procesos en que participa

Laura Varas¹, Eva Revilla¹, Javier Sierra² y Isabel Rodríguez¹

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid, ²Departamento de Biotecnología. Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

El gen *dachsous* (*ds*) de *Drosophila* codifica una caderina atípica con una estructura similar a las caderinas clásicas pero difiere funcionalmente de éstas. *Ds* es uno de los componentes esenciales de la vía *dachsous/fat* que participan en el establecimiento de la polaridad planar celular (PPC). Datos genéticos indican que *Ds* también juega un papel importante en el control de la proliferación celular y en la formación de patrón de las estructuras imaginales, mediante un mecanismo todavía desconocido. Con el fin de dilucidar la contribución de las regiones extracelular y citoplasmática

en cada una de estas funciones, hemos realizado un estudio de la estructura genómica del gen y la caracterización molecular de los diferentes alelos mutantes utilizados en el análisis genético, para poder establecer una correlación entre los fenotipos observados y la lesión molecular correspondiente. Nuestros datos demuestran que *dachsous* consta de 12 exones que se combinan para dar lugar a distintos cDNA por *splicing* alternativo y todas las isoformas que se localizan en la membrana plasmática, y por tanto funcionales, contienen la región citoplasmática indicando que esta región es esencial en todos los procesos celulares en los que participa la proteína *Ds*.

P03-4

Análisis comparativo de la región citoplasmática de las caderinas de polaridad planar celular *Dachsous* de *Drosophila* y *Dachsous1*, *Dachsous2* y *CDH23* murinas

Eva Revilla Yates¹, Isabel Rodríguez Enríquez¹, Laura Varas Jimenez¹ y Javier Sierra Isturiz²

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid, ²Departamento de Biotecnología. Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón

La polaridad planar celular (PPC) es el proceso por el que se establece una polaridad en el plano del epitelio generando estructuras asimétricas. La proteína *Dachsous* (*Ds*) de *Drosophila* es uno de los componentes de la vía *Dachsous/Fat* que participan en el establecimiento de la PPC. *Ds* pertenece a la familia de las caderinas atípicas, que son proteínas de membrana constituidas por una región extracelular, un dominio transmembrana y una pequeña región citoplasmática; ésta última parece jugar un papel determinante en todos los procesos celulares en los que participa la proteína *Ds*. En vertebrados se han descrito los genes *dachsous1* y *dachsous2* en función de su homología a nivel de secuencia con el gen *dachsous* de *Drosophila*, pero sus funciones no han sido estudiadas. Así mismo, la proteína *CDH23*, una caderina homóloga a *Dachsous* a nivel de estructura, participa en el mecanismo de PPC durante la formación del oído interno de vertebrados. En el ser humano, mutaciones en *CDH23* son responsables del Síndrome de Usher, la forma más frecuente de sordera y ceguera congénitas. Con el objetivo de determinar el ortólogo de *Dachsous* en vertebrados, hemos realizado un análisis *in silico* de la región citoplasmática de las proteínas *Ds1*, *Ds2*, *CDH23* y *Ds* con el fin de identificar los dominios conservados en esta región. Para entender la función de la región citoplasmática de las cuatro proteínas y de los diferentes dominios conservados, hemos generado

moscas transgénicas con la región citoplasmática completa de *ds*, *ds1*, *ds2* y *CDH23* así como con formas truncadas de la región citoplasmática de *Dachsous* que eliminan dichos dominios. Se presentarán los fenotipos observados en ensayos de sobreexpresión en un fondo silvestre y de rescate en mutantes de falta de función *dachsous*.

P03-5

The Exportin5-aatRNA-EF1A complex mediates the nuclear export of SNAG-containing proteins

José Manuel Mingot¹, Sonia Vega¹, Amparo Cano², Francisco Portillo² y M. Ángela Nieto¹

¹Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH, San Juan de Alicante, ²Departamento de Bioquímica UAM-Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid

Exportin 5 mediates the nuclear export of dsRNAs including pre-miRNAs, adenoviral RNAs and tRNAs. When tRNAs are aminoacylated, the aatRNA-Exportin5 complex recruits and co-exports the elongation factor eEF1A. Through the combination of nuclear export assays and yeast double-interaction screens, we show that eEF1A recruits Snail transcription factors in the nucleus, thereby being co-transported by the aatRNA-Exportin5 complex to the cytoplasm. Snail binds to eEF1A through the SNAG domain, a novel protein nuclear export signal (NES). This new complex provides a mechanism to remove SNAG-containing transcription factors from their target promoters limiting their activity and exporting them to the cytoplasm.

P03r-6

El corregulador transcripcional PadA regula el inicio del desarrollo en *Dictyostelium discoideum*

Ane Garcíandía Sesma y Teresa Suárez
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid

La ameba social eucariota *D. discoideum* se encuentra en la frontera de la multicelularidad; alternando un ciclo de vida unicelular en presencia de nutrientes con una fase multicelular en ausencia de éstos. En la fase unicelular las amebas se dividen y en la multicelular tienen lugar la diferenciación celular y el desarrollo: a partir de una población de amebas idénticas se diferencian las células tallo y las esporas, formando un cuerpo fructífero encargado de la dispersión de las últimas.

La transición crecimiento-desarrollo activada por el ayuno conlleva un complejo proceso de agregación celular,

mediada principalmente por la quimiotaxis hacia el AMP cíclico.

PadA es una proteína del tipo NmrA que pertenece a una clase de correguladores transcripcionales que usan NAD(P) + como cofactores, pudiendo detectar el estado metabólico de la célula. El mutante *padA* porta un alelo que codifica una proteína truncada (PadAD276) que carece de los últimos 25 aminoácidos del C-terminal. *padA* tiene un fenotipo pleiotrópico, donde el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo están afectados.

Nuestros resultados muestran que *padA* es una mutación de falta de función, ya que no se detecta proteína PadA en el mutante. El trabajo expuesto se centra en el estadio inicial del desarrollo: la agregación. *padA* forma 50 veces más centros de agregación y con "streams" más cortos que la cepa silvestre, sin embargo no parece que la movilidad o la quimiotaxis hacia el AMPc estén afectadas. Además la inducción del RNAm de los genes implicados en la señalización del AMPc al inicio del desarrollo no alcanzan el 50% de los niveles silvestres.

Proponemos que PadA es necesaria para la formación de territorios del tamaño adecuado, probablemente modulando los genes de la señalización del AMPc.

P03r-7

Expression of ubiquitous aquaporins in chorionic villosity of pregnant women

Javier Escobar¹, Alessandro Arduini², María Gormaz³, Karien Gosens⁴, Anabel Martínez⁵, Alfredo Perales⁵, Raquel Escrig³, Enrique Tormos⁶ y Máximo Vento⁷

¹Neonatal Research Unit, Research Institute Hospital La Fe, Valencia, ²Department of Physiology, University of Valencia, Burjassot, ³Division of Neonatology, University Hospital La Fe, Valencia, ⁴Department of Obstetrics & Neonatology, UMC St Radboud, Nijmegen (The Netherlands), ⁵Division of Obstetrics, University Hospital La Fe, Valencia, ⁶Division of Obstetrics and Division of Neonatology, University Hospital La Fe, Valencia, ⁷Division of Neonatology, University Hospital La Fe, and Research Unit, Research Institute Hospital La Fe, Valencia

Background: Aquaporins (AQPs) constitute a family of proteins functioning as cell membrane water channels. Altogether 13 AQPs (AQP0-12) have been described, and although expressed in a variety of tissue their precise function still remains unclear. To date, AQPs 1, 3, 8, and 9 expression has been found in human placenta and fetal membranes; however, AQP4 is the only aquaporin identified in the first trimester of human pregnancy.

Objectives: To verify if AQP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 11 are expressed in chorionic villi in the first trimester of pregnancy.

Population and Methods: Chorionic villi samples were collected in pregnant women for prenatal diagnosis and analyzed by real time-PCR to assess the cDNA expression of AQP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 11.

Results: A total of 26 samples of chorionic villi corresponding to 26 pregnant women (age: 32.7 ± 4.5 y; gestational age: 12.4 ± 0.9 weeks) were analyzed. Karyotype was normal in 16 cases; trisomy was found in 6 cases (3 with mosaicism and 1 unknown). High expression of AQP1, 3, 9, and 11, low expression of AQP4, 5, and 8, and no expression of AQP2, 6, and 7 was found.

Conclusions: This is the first study systematically assessing the expression of a multiplicity of AQPs in chorionic villi samples during the first trimester of pregnancy. AQP1, 3, 9, and 11, the latter for the first time, have been identified during pregnancy. Chromosomal abnormalities did not alter AQPs expression.

P03r-8

Autofagia en el desarrollo temprano del oído interno

María Rodríguez Aburto¹, Marta Magariños Sánchez², Hortensia Sánchez Calderón³, Patricia Boya⁴, Enrique de la Rosa⁵ y Isabel Varela-Nieto⁶

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, ²Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, ³Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, ⁴Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Departamento de Medicina Molecular y Celular, Laboratorio 3D, Madrid, ⁵Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ⁶Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid Unit 761, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid

La autofagia es una vía lisosomal de degradación muy conservada que previene la acumulación de proteínas y orgánulos dañados y que tiene un papel clave en el desarrollo de vertebrados. El desarrollo temprano del oído interno requiere una estricta regulación de los procesos de proliferación celular, supervivencia, migración y diferenciación con el fin de generar la mayoría de los tipos celulares del oído interno adulto incluyendo las neuronas del ganglio auditivo-vestibular. Para investigar el papel de la autofagia en el desarrollo temprano del oído interno se ha examinado la expresión de la maquinaria molecular de la autofagia y las consecuencias de su inhibición con 3-metiladenina (3-MA) en cultivos organotípicos de explantes de

vesícula ótica. En este trabajo demostramos que el mecanismo de autofagia está presente en el oído interno en desarrollo *in vivo* y que los inhibidores de la autofagia modifican la relación LC3-I/LC3II. El bloqueo de la autofagia con 3-MA causa la acumulación de células TUNEL-positivas y la desregulación del ciclo celular. Además, la neurogénesis ótica se ve gravemente afectada tanto en la producción del número adecuado de precursores neuronales como en el correcto crecimiento axonal. Finalmente, nuestros resultados indican que la autofagia proporciona la energía necesaria para que se produzca la fagocitosis de las células neuroepiteliales que mueren por apoptosis. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la autofagia es un proceso activo durante el desarrollo temprano del oído interno, siendo esencial para la morfogénesis del epitelio ótico y la organización del ganglio auditivo-vestibular.

P03r-9

Efecto contrario del péptido opioide β -endorfina sobre los procesos de capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides humanos

Nerea Subirán¹, Haizea Estomba¹, Itziar Urizar¹, M Luz Cándenas², Francisco M Pinto², Asier Valdivia¹ y Jon Irazusta¹

¹Departamento de Fisiología. UPV/EHU, Leioa, ²Instituto de Investigaciones Químicas. CSIC, Sevilla

Los espermatozoides resultantes de la espermatogénesis necesitan adquirir capacidad de fecundación durante su viaje hacia el óvulo ya que son incapaces de fertilizar el ovocito tanto *in vivo* como *in vitro* y necesitan sufrir grandes cambios que se producen en el tracto reproductor femenino. De manera secuencial los espermatozoides deben producir primero la capacitación para que se induzca la reacción acrosómica. Estos procesos se encuentran regulados por sistemas de comunicación celular entre los que se encuentra sistema opioide. La β -endorfina es un péptido opioide endógeno que es sintetiza por proteólisis la proopiomelanocortina (POMC) y que parece estar implicada en regular la función espermática. Específicamente, la POMC se expresa mayoritariamente en las células espermatogénicas de testículos de rata y ratón. El objetivo de nuestro estudio fue estudiar la presencia de POMC en espermatozoides humanos y el efecto de la β -endorfina en los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

La expresión y localización de POMC se determinó por RT-PCR e inmunocitoquímica. Realizamos estudios dosis-dependientes de β -endorfina sobre la capacitación y la reacción acrosómica por citometría de flujo. El mRNA del precursor POMC no está presente en espermatozoides,

mientras que su proteína se localiza en el flagelo de los espermatozoides. La β -endorfina activa de manera dosis-dependiente de la capacitación espermática mientras que tiene un efecto inhibitorio sobre la reacción acrosómica. La β -endorfina participa en los procesos de capacitación y reacción acrosómica de manera contraria por lo que podría ser esencial para regular en cada momento el estado funcional de los espermatozoides.

P04. Biología Molecular Teórica

P04-1

Valoración de una RT-PCR múltiple en tiempo real para diagnóstico de la gripe

Eva Soto Palomino, Encarnación de la Torre Tejedor, Gabriel Sanjuan Garriga, Ana Ponce Rodríguez y M^a Gema Codina Grau
Vall d'Hebron-Institut de Recerca, Barcelona

Introducción: Estamos en el periodo inmediato post-pandémico de influenza A H1N1 variante nueva (2009). Presentamos los resultados de la detección de virus influenza A (H1N1 variante nueva y estacional) y B por RT-PCR en tiempo real en pacientes con sospecha de gripe y criterios de ingreso hospitalario.

Material y métodos: Se estudia 1305 muestras de 1095 pacientes (noviembre de 2010 a marzo de 2011). Se realizó extracción automatizada de ácidos nucleicos *EasyMag (Biomérieux)* y RT-PCR (detección con *ProFlu*, y subtipado con *ProFlu influenza A subtyping, Prodesse*) los días laborables (865 muestras); y extracción de ácidos nucleicos con RT-PCR (detección y subtipado) en un único proceso (*Xpert Flu, Cepheid*) los días festivos (230 muestras).

Resultados: Se encontró influenza A en 299 casos (244 H1N1 variante nueva y 65 estacional), y B en 91. Primero apareció la gripe A H1N1 variante nueva (máximo en enero) y luego la B y la A estacional (máximo en febrero). Los pacientes con determinaciones repetidas correspondían a 45 casos con patología grave de base y varios episodios de infección, 25 pacientes con alta sospecha de gripe y neumonía grave en los que la primera determinación fue negativa y 24 ingresados con gripe en los que se hizo control para levantar el aislamiento. Solo en 2 casos de sospecha de gripe severa no confirmada, la segunda muestra fue positiva. Todos los pacientes con influenza A menos tres se pudieron desaislar a la semana.

Conclusiones: Las dos técnicas permiten hacer el diagnóstico en pocas horas, lo que facilita un aislamiento

correcto. *Xpert Flu* es muy sencilla de realizar y se puede asumir con personal con poca experiencia. Han coexistido influenza A H1N1 variante nueva y estacional, por lo que es necesario seguir realizando el tipado.

P05. Biomembranas y Bioenergética

P05-1

Los canales de potasio Kv1.3 y Kv1.5 en cáncer

Joanna Bielanska¹, Javier Hernández-Losa², Mireia Pérez-Verdaguer¹, Teresa Moline², Rosa Somoza², Santiago Ramón y Cajal², Enric Condom³, Joan Carles Ferreres² y Antonio Felipe¹
¹Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, ³Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat

Los canales iónicos de membrana participan en numerosos procesos oncogénicos tales como la proliferación, la migración y la invasión. Estos fenómenos contribuyen a la generación de la metástasis. Numerosas evidencias indican que los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) están implicados en la proliferación de muchos tipos celulares, incluyendo las tumorales. Los Kv han generado un gran interés como posibles dianas en la generación de terapias anti-tumorales. Por lo tanto un prerrequisito para su uso terapéutico es su estudio como potenciales biomarcadores. Ya que Kv1.3 y Kv1.5 participan en la proliferación de diversos tipos celulares nos propusimos su estudio en toda una gran variedad de tumores humanos. Hemos analizado muestras de glándula mamaria, estómago, riñón, vejiga urinaria, pulmón, piel, colon, ovario, páncreas, cerebro, nódulo linfático, músculo esquelético de muestras sanas y sus respectivos tumores. Mientras que la expresión de Kv1.3 fue heterogénea, ya que era elevada, menor o invariable en muchos tumores, la expresión de Kv1.5 fue, generalmente, abundante. En muchos casos, la expresión de Kv1.3 se asocia a la presencia de células linfoblásticas de naturaleza inflamatoria. Independientemente de la utilidad de los canales iónicos como dianas terapéuticas, la identificación de un fenotipo específico en los diversos tumores podría tener valor diagnóstico por sí mismo. Nuestros resultados indican que Kv1.5, y en algunos casos Kv1.3, se expresan de forma anómala en varios tipos de cáncer humano. Estos canales podrían servir tanto como nuevos biomarcadores de un tipo metastático como dianas terapéuticas

potenciales. El uso de los Kv como dianas farmacológicas o marcadores de prognosis atrae un enorme interés y asegura investigaciones futuras.

P05r-2

Cambios en la expresión y distribución de Tau en el cerebro de ratón durante el envejecimiento y sus efectos funcionales sobre las Ca²⁺-ATPasas

María Vázquez-Hernández, M. Rosario Sepúlveda y Ana M. Mata

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz

La alteración en neuronas de la homeostasis de Ca²⁺ y del estado de agregación de la proteína Tau son dos características típicas de neurodegeneración asociada al envejecimiento o a determinadas patologías. En este trabajo se ha analizado la posible relación entre Tau y el Ca²⁺ intracelular durante el envejecimiento a través de su efecto sobre las ATPasas transportadoras de Ca²⁺, proteínas implicadas en la regulación del Ca²⁺ intracelular. Para ello, se utilizaron ratones adultos controles de 3 meses y viejos de 15 meses, cuya capacidad de aprendizaje y memoria se evaluó mediante diferentes tests de comportamiento. Las dificultades observadas en los ratones viejos se correlacionaron con un deterioro de sus hipocampos, observado a nivel histológico mediante la tinción cresil violeta y la acumulación de autofluorescencia debida a la lipofuscina. Ensayos de Western blots mostraron un mayor contenido de Tau fosforilado en los cerebros de ratones viejos, asociado a un cambio de localización de Tau, principalmente en hipocampo, observado mediante análisis inmunohistoquímico. Experimentos paralelos no mostraron cambios en el contenido, localización y actividad de las distintas Ca²⁺-ATPasas en el cerebro con la edad. Sin embargo, ensayos funcionales in vitro mostraron un efecto inhibitorio de la proteína Tau purificada sobre la actividad Ca²⁺-ATPasa, que era más evidente en los ratones de menor edad. Futuros estudios a nivel molecular permitirán profundizar en la interacción Tau/Ca²⁺-ATPasas.

Nota: Financiación: MICINN (BFU2008-00182), Fundación Marcelino Botín, Junta de Extremadura, FEDER.

P05-3

La proteína ArsH de *Synechocystis* es una NADPH: quinona óxido-reductasa

José A. Navarro, Pilar León, Luis López-Maury, Francisco J. Florencio y Manuel Hervás

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, cicCartuja, Universidad de Sevilla y CSIC, Sevilla

La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 contiene un operón *ars* (compuesto por los genes *arsB*, *arsC* y *arsH*) inducible por arsénico, que codifica tres proteínas: ArsB, que es un transportador de arsénico(III); ArsC, que es una reductasa de arseniato dependiente de glutatión/glutarredoxina, y ArsH, cuya función es desconocida. ArsH es una flavoproteína (27 kDa) que contiene flavín-mononucleótido (FMN) como cofactor y presenta un dominio de unión a NADPH. Al contrario que otras ArsH bacterianas, la proteína de *Synechocystis* carece de actividad arseniato reductasa. La funcionalidad de ArsH ha sido estudiada mediante medidas bioquímicas de actividad en estado estacionario, así como mediante análisis cinéticos con técnicas de cinética rápida, como son la espectroscopia de excitación por láser y el *stopped-flow*. Nuestros datos indican que la ArsH de *Synechocystis* es una quinona-reductasa dependiente de NADPH, teniendo preferencia por quinonas con sustituyentes hidrófobos. Aunque el enzima es capaz de estabilizar la forma semiquinona del FMN, la reducción de quinona implica a la forma hidroquinona del cofactor, y ocurre mediante un mecanismo enzimático de tipo ping-pong, en el que los dos sustratos se unen en el mismo sitio activo de la proteína. Las reductasas de quinonas han sido descritas como agentes antioxidantes, por lo que ArsH podría funcionar como una proteína de resistencia al estrés oxidativo inducido por arsénico, y quizás como un donador alternativo de electrones en circunstancias de estrés.

P05-4

Resistencia a fármacos citotóxicos y fungicidas en levadura mediante complementación funcional de la ATPasa vacuolar por pirofosfatasa de membrana translocadoras de protones de origen vegetal

José R. Pérez-Castiñeira, Agustín Hernández y Aurelio Serrano

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, Sevilla

Las ATPasas vacuolares (V-ATPasas) son complejas bombas primarias de protones que juegan un papel esencial en la

generación de gradientes electroquímicos en sistemas de endomembranas. Otra bomba de H⁺ más simple que la V-ATPasa y que se colocaliza con ella se encuentra en las plantas y muchos protistas: la pirofosfatasa inorgánica translocadora de H⁺ (H⁺-PPasa) formada por una única subunidad. La expresión de fusiones traducionales de la región N-terminal de la H⁺-PPasa del protista *Trypanosoma cruzi* con su ortólogo vacuolar AVP1 de la planta *Arabidopsis thaliana* dirige estas quimeras preferentemente a las membranas internas de *S. cerevisiae*, aliviando eficazmente los fenotipos asociados a la deficiencia en V-ATPasa siempre que la PPasa citosólica esté inactiva. Esta complementación fenotípica se logró tanto si la V-ATPasa de la levadura estaba específicamente inhibida por antibióticos citotóxicos (bafilomicina A1) o fungicidas mofolinos (tridemorph), como en la estirpe mutante *Vma1*, deficiente en una subunidad catalítica de la V-ATPasa. Mediante colorantes fluorescentes se demostró que la acidificación de la vacuola se recupera y la vía endocítica se normaliza en mutantes *vma⁻* expresores de las H⁺-PPasas heterólogas. Además, estudios bioquímicos e inmunoquímicos mostraron que estas H⁺-PPasas se localizan preferentemente en la membrana vacuolar. Estos resultados demuestran la capacidad de la H⁺-PPasa para generar por sí sola gradientes de pH fisiológicamente competentes. Además, la estrategia usada plantea nuevos métodos de tolerancia a fármacos citotóxicos y de estudio sobre posibles funciones alternativas de las V-ATPasas de hongos y animales, distintas de la mera acidificación de orgánulos intracelulares.

Nota: Proyectos P07-CVI-03082 y BFU2010-15622 (JA, MICINN y FEDER).

P05-5

Imaging the early stages of phospholipase C/sphingomyelinase activity on vesicles containing coexisting ordered-disordered and gel-fluid domains

L. Ruth Montes¹, Maitane Ibaguren², David Lopez², Jesus Sot¹, Alicia Alonso¹ y Felix Goñi¹

¹Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EHU), Leioa,

²Universitat de les Illes Balears, Balearic Islands

The binding and early stages of activity of a phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa* on giant unilamellar vesicles (GUV) have been monitored using fluorescence confocal microscopy. Both the lipids and the enzyme were labelled with specific fluorescent markers. GUV consisted of PC, SM, PE and cholesterol at equimolar ratios, to which 5-10 mol% of the enzyme end-

products Cer and/or DAG were occasionally added. Morphological examination of the GUV in the presence of enzyme reveals that, although the enzyme diffuses rapidly throughout the observation chamber, detectable enzyme binding appears to be a slow, random process, new bound-enzyme containing vesicles appearing along several minutes. Enzyme binding to the vesicles appears to be a cooperative process. After the initial cluster of bound enzyme is detected, further binding and catalytic activity follow rapidly. After the activity is started the enzyme is not released by repeated washing, suggesting a "scooting" mechanism for the hydrolytic activity. The enzyme binds preferentially the more disordered domains and, in most cases, the catalytic activity causes the disordering of the other domains. Simultaneously, peanutshaped (8-shaped) vesicles containing two separate lipid domains become spherical. At a further stage of lipid hydrolysis, aggregates are formed and vesicles disintegrate.

P05-6

Efecto de un biotensioactivo trealosalípido sobre la actividad de la fosfolipasa A₂

Ana Zaragoza Martínez, Francisco J. Aranda Martínez, José A. Teruel Puche y Antonio Ortiz López

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Murcia

Los biotensioactivos trealosalípidos constituyen un grupo emergente de compuestos de gran interés. Debido a sus propiedades antimicrobianas, antiadhesivas, anticancerígenas e inmunomoduladoras, así como a que son considerados más seguros que compuestos análogos de naturaleza sintética, podrían ser utilizados en el campo de la medicina. En este estudio se eligió la fosfolipasa A₂ (PLA₂), implicada en diferentes procesos celulares, incluyendo metabolismo y digestión de lípidos así como producción de precursores de procesos inflamatorios. Se han llevado a cabo experimentos con FTIR y espectroscopía de fluorescencia para estudiar el efecto de un trealosalípido (TL) secretado por *Rhodococcus* sp, sobre la actividad de la PLA₂. Estudios de actividad mostraron que la presencia de trealosalípido a una concentración por debajo de la concentración micelar crítica del tensioactivo (0.3 mM) inhibía la actividad de la proteína alrededor de un 50% y esta inhibición era máxima media hora después de su incubación con el TL. Mediante FTIR se observó que la presencia de TL provocaba cambios conformacionales en la proteína, siendo necesarios alrededor de 30 minutos de incubación para que se produjeran estos cambios. Los datos de atenuación de la fluorescencia del

triptófano por acrilamida mostraron que la interacción del TL con la PLA₂ reduce la exposición de los residuos de triptófano así como la K_{SV}. Teniendo en cuenta que los residuos de Trp están implicados en la unión de la PLA₂ a su sustrato, nuestros resultados parecen indicar que el cambio conformacional provocado por la presencia de TL impediría o dificultaría la unión de la PLA₂ a los fosfolípidos de la membrana, disminuyendo así la actividad de la proteína.

Nota: Subvencionado por el MCINN (Proyecto CTQ2007-66244 a A.O.).

P05r-7

La fosforilación reversible de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 modula su función y localización en células HEK293

Patricia Tomás Martín, Francisco Javier Martín Romero y Eulalia Pozo Guisado

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz

La entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ de membrana plasmática regulados por depósitos intracelulares (store-operated calcium channels, SOCs) constituye una vía fundamental para el transporte y para la señalización intracelular mediada por Ca²⁺ en células eucariotas. Sin embargo, los detalles moleculares por los que los canales SOCs se activan durante la depleción de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (principalmente el retículo endoplasmático, RE) no se encuentran del todo esclarecidos. STIM1, una proteína transmembranal localizada en el RE, actúa como sensor del nivel de Ca²⁺ intraluminal y como activador de canales SOCs, entre los que se encuentra ORAI1. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la fosforilación de STIM1 en residuos diana de la actividad ERK1/2 es necesaria para alcanzar una activación completa de esta vía de entrada de Ca²⁺. Empleando células HEK293 transfectadas de forma estable, mostramos aquí que esta fosforilación regula varios procesos necesarios para activar ORAI1: (1) la multimerización de STIM1, determinada mediante microscopía confocal; (2) su reclutamiento en zonas próximas a la membrana plasmática, monitorizado mediante TIRFM; y (3) la unión física a ORAI1, cuantificada mediante FRET y co-inmunoprecipitación. Además, hemos observado que la desfosforilación de STIM1 en estos residuos es necesaria para desactivar estos mismos procesos y que la fosforilación constitutiva de STIM1 induce importantes alteraciones celulares, entre las

que destaca el incremento de aberraciones en la segregación cromosómica (aneuploidías).

Nota: Financiado por MICINN (BFU2008-00104) y Junta de Extremadura (GR10125).

P05-8

Permeabilización de membranas por el propéptido NH₂-terminal de la proteína SP-B del surfactante pulmonar (SP-BN)

Ángeles Bañares Hidalgo, Jesús Pérez-Gil y Pilar Estrada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

El surfactante pulmonar se sitúa en la interfase aire-agua de los alveolos pulmonares evitando su colapso tras la espiración. Dos proteínas hidrofóbicas, SP-B y SP-C, son fundamentales para dicha función. Durante el tránsito hacia el retículo endoplasmático, es indispensable el propéptido NH₂-terminal de la SP-B (SP-B_N) para que se produzca la maduración de la SP-B. SP-B_N forma parte de la familia de las proteínas tipo saposina que presentan enlaces disulfuro lo que les otorga gran resistencia a proteasas y a la temperatura elevada. Los miembros de esta familia establecen interacciones transitorias o permanentes con lípidos. Para comprobar si SP-B_N es capaz de provocar la rotura de membranas, se han llevado a cabo experimentos de *leakage* sobre LUVs. La liberación de contenidos acuosos de las vesículas ocasiona un incremento en la intensidad de fluorescencia del ANTS al no quedar apagada por DPX. Diferentes experimentos en los que se ha variado la composición de lípidos, la concentración de proteína y el pH del medio, han permitido caracterizar el comportamiento de SP-B_N en diferentes medios lipídicos. Particularmente, se ha analizado el efecto de la proteína sobre vesículas formadas por una mezcla de DPPC/POPG (7/3), porcentaje que se asemeja al existente en el surfactante pulmonar. La SP-B_N permeabiliza las vesículas al variar el pH del medio desde la neutralidad, donde no tiene lugar *leakage*, hacia valores más ácidos, obteniéndose un pK de 5.2 y una permeabilización máxima por debajo de 4.5, pH al que SP-B_N se autoasocia formando un *coiled-coil*. Otras saposinas también producen permeabilización de vesículas a pHs cercanos a 4.5. A pH ácido, se observa una dependencia hipérbolica de la liberación de contenidos de las LUVs modelo con la concentración de proteína.

P06. Bioquímica de la Nutrición

P06-1

Efecto de las procianidinas de pepita de uva (GSPE) sobre la inflamación en ratas Zucker fa/fa

Victor Pallarès, Lidia Cedó, Anna Castell-Auví, Montserrat Pinent, Anna Ardévol y Mayte Blay
 Departamento de Bioquímica y Biotecnología,
 Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili,
 Tarragona

Las proantocianidinas son unos compuestos fenólicos presentes en diversos alimentos como frutas, verduras o bebidas derivadas de estos. Es bien conocido que estas moléculas tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, entre otros, los cuales pueden ejercer beneficios sobre enfermedades como la aterosclerosis, la insulinorresistencia o la obesidad. Nuestro objetivo fue comprobar si las procianidinas podían tener un efecto anti-inflamatorio en un modelo de obesidad genética.

10 ratas Zucker fa/fa obesas genéticamente fueron tratadas crónicamente (10 semanas) con extracto de procianidinas de pepita de uva (GSPE) a una dosis moderada (35 mg/kg). 10 ratas Zucker fa/fa y 10 Zucker con normopeso fueron nuestras control. Los niveles de proteína C-reactiva (CRP) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) fueron analizados en diferentes tejidos y en plasma como parámetros pro-inflamatorios. Se realizó una PCR a tiempo real de muestras de tejido adiposo mesentérico (TAM) para analizar la expresión de diferentes genes pro y anti-inflamatorios.

Los niveles de CRP de las ratas tratadas con GSPE tendieron a disminuir en plasma, TAM e hígado respecto a las fa/fa control, al igual que el TNF- α en hígado. Por otro lado, los niveles de expresión de los genes pro-inflamatorios Tnf- α , Il-6, Crp y Emr1, un marcador de macrófagos, tendieron a la disminución, mientras que los de la anti-inflamatoria adiponectina tendieron a aumentar en ratas tratadas con GSPE respecto a las fa/fa control. En resumen, estos resultados sugieren que las procianidinas podrían actuar de un modo anti-inflamatorio a niveles fisiológicos y de expresión génica en ratas obesas genéticamente.

Nota: Este trabajo se ha financiado por las becas AGL2008-00387 y AGL2008-01310 concedidas por el MEYC.

P06-2

Preliminary results of epitope mapping on cross-reactive allergens of cow's milk and soy

Sebastian Trejo¹, Angela Candreva², Mario Ferrer-Navarro¹, Francesc Avilés¹, Guillermo Docena³ y Silvana Petruccelli²

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata (Argentina), ³Laboratorio de Investigaciones el Sistema Inmune (LISIN), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata (Argentina)

Cow's milk (CM) and soy have become relevant food allergens, mainly due to the high exposition to these allergens in the general population. Besides, soy-based formulas are frequently used substitutes in CM allergic patients under the age of two. However, clinical intolerance has been observed and it may be explained by the cross-reactivity previously described between these allergenic proteins. Bovine caseins and 7S and 11S soy glycinins were described as cross-reactive proteins. Using different assays with monoclonal antibodies (mAb) specific to bovine caseins, we have investigated the antigenic properties of CM and soy proteins. In order to identify the epitopes recognized by these antibodies (linear B epitopes-LBE), purified caseins were enzymatically digested. The resulting peptides were separated by RP-HPLC and analyzed by dot blot using three casein-specific mAbs, and finally they were identified by MALDI-TOF MS. In parallel, antibodies were immobilized onto magnetic beads and afterwards incubated with the peptide mixture previously obtained by proteolysis. MALDI-TOF analysis was performed to compare bound and unbound peptide profiles. Using different proteolytic enzymes we have found that casein-specific mAbs recognize at least three peptides (two on α S1-casein and one on κ -casein) all of them containing LBE. The sequence of these peptides has been confirmed by MALDI-TOF/TOF. By means of bioinformatic tools we have found that these immunogenic epitopes are also expressed in different soy allergenic proteins. In conclusion, we have detected CM epitopes that may cross-react with soy allergens. They might constitute potential targets to reduce the allergenicity of soy compounds, or vaccine candidates to develop tolerance in patients with food allergy.

P06-3

Estudio de los efectos de una restricción calórica moderada durante la lactancia en ratas sobre la capacidad de regulación del peso corporal en las crías ante una dieta hiperlipídica y posibles mecanismos implicados

Mariona Palou March, Teresa Priego Cuadra, Juana Sánchez Roig, Juana María Torrens García, Andreu Palou Oliver y Catalina Picó Segura

Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (Nutrigenómica), Universidad de las Islas Baleares y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Palma de Mallorca

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a largo plazo de una restricción calórica moderada en ratas lactantes sobre la expresión de genes clave implicados en el balance energético de sus descendientes (CR), así como las adaptaciones a la alimentación con una dieta hiperlipídica (HF). Las madres fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta normolipídica (NF) o se sometieron a un 30% de restricción calórica durante el periodo de lactancia. Tras el destete, las crías se alimentaron con una dieta NF hasta las 15 semanas de edad, y luego con una dieta NF o HF hasta las 28 semanas, cuando se sacrificaron. Se siguió el peso corporal e ingesta y se analizaron parámetros sanguíneos y la expresión de genes clave en hipotálamo y tejido adiposo blanco (TAB). Las CR presentaron menor peso e ingesta respecto a sus controles (C). Los machos CR fueron resistentes al incremento de los niveles circulantes de insulina y leptina, que se observa en C tras la dieta HF, y las hembras CR alimentadas con ésta dieta mostraron menores niveles de triglicéridos circulantes tras 12-h de ayuno respecto a C. En hipotálamo, los machos CR presentaron mayores niveles de mRNA del ObRb respecto a sus C; las hembras CR mostraron mayor expresión de mRNA del InsR en comparación a sus C. Los machos CR mantuvieron la capacidad del TAB para captar, almacenar y oxidar las grasas ante una dieta HF, mientras que esta capacidad se vio deteriorada en C, y las hembras CR presentaron mayores niveles de mRNA del ObRb respecto a C. Estos resultados sugieren que una restricción calórica moderada en ratas lactantes protege a su descendencia frente a la obesidad inducida por la dieta, incrementando su sensibilidad a la insulina y la leptina, pero de forma diferencial dependiendo del sexo.

P06-4

Las células 3T3L1 incrementan la síntesis de lípido en presencia de algunos aminoácidos y captan (pero no incorporan) triacilgliceroles de liposomas

David Sabater Martínez, José Antonio Fernández López, Xavier Remesar Betllloch y Marià Alemany Lamana

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona

Se han utilizado cultivos estándar de células 3T3L1 diferenciadas a adipocitos. Se ha observado que la incubación con diferentes sustratos modifica significativamente la cantidad de lípido acumulado en sus vacuolas, medido mediante tinción con Oil-Red O, extracción con isopropanol y valoración espectrofotométrica. La exposición de las células a aminoácidos (AA) 0,5 mM durante 24 h no mostró diferencias en acumulación de lípido con respecto a los controles (glucosa sola) para Gln, Leu, Arg y Orn, pero los lípidos se incrementaron hasta un 20 % respecto a los controles con Ile o Glu, y algo menos con Val, Ala y Cit. Estas diferencias se atribuyen no sólo a la diferente capacidad de formar acetil-CoA (similar para todos los AA de cadena ramificada) sino especialmente a la posibilidad de exportar el N de los AA como grupo amino (Ala) o amido (Gln), o la formación de propionato (Ile). No parece que los precursores del NO• (Arg, Orn, Cit) afecten a la acumulación de lípido en este modelo. El análisis de las imágenes mostró una normalidad vacuolar para los AA, aunque con diferencias en el tamaño de las células. La exposición de las células 3T3L1 a liposomas (Intralipid) produjo una acumulación de lípido proporcional al tiempo y a la concentración: de 0 hasta 5% (máximo), aunque descendió a concentraciones aún mayores. Los liposomas eran captados en proporción a su concentración, pero se mantuvieron inalterados, como microvacuolas, dentro de las células, promoviendo eventualmente su rotura a concentraciones elevadas. Hay una captación efectiva de los liposomas que no se basa en la hidrólisis de sus triacilgliceroles por lipasas y la resíntesis en la célula, sino en su simple acumulación.

P06-5

Metabolization in rats of non-extractable proanthocyanidins, an underestimated fraction of dietary polyphenols

María Luisa Mateos-Martín¹, Jara Pérez-Jiménez¹, Elisabet Fuguet² y Josep Lluís Torres¹

¹Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, CSIC (IQAC-CSIC), Barcelona, ²Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Barcelona

Proanthocyanidins (PA) are a class of dietary polyphenols whose intake has been associated with the prevention of several chronic diseases. Studies on their content, metabolization and *in vivo* effects are based on the assumption that PA present in foods are fully extracted with acetone 70%. Recent works suggest that in the residues of those extractions there is a significant fraction of PA, the non-extractable PA (NEPA). However, its possible metabolization has not yet been addressed. The aim of this work was to study the metabolization of NEPA by the analysis of their derived metabolites in urine and faeces from rats.

NEPA were obtained from Grape Antioxidant Dietary Fibre, a by-product from wine making. An extraction with acetone 70% was carried out in this product and the corresponding residue (NEPA) was freeze-dried. A group of female Sprague-Dawley rats ($n=5$) was administered by oral gavage a NEPA suspension in water, while the control group ($n=5$) was administered tap water. The presence of PA metabolites (including both phase II metabolites and microbially derived metabolites) in urine and faeces collected for 24 h after the supplementation was evaluated by LC/ESI-QqQ-MS/MS techniques.

Ten phase II metabolites from (epi)catechin, the main monomer in NEPA, were detected in urine from rats supplemented with NEPA, as well as 20 microbially derived metabolites. Three of these metabolites, free (epi)catechin and a procyanidin dimer were also detected in faeces.

These results are the first evidence that NEPA are a source of absorbable phenolic compounds which are progressively released for at least 24 h after their intake.

Note: Work funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2009-12374-C03-03/ALI, Sara Borrell postdoctoral contract for J.P.-J.)

P07. Bioquímica Perinatal

P07r-1

Los efectos protectores de la ingesta de leptina durante la lactancia frente al desarrollo de obesidad en la edad adulta pueden estar asociados con cambios en la metilación del promotor del gen de la proopiomelanocortina

Mariona Palou March¹, Catalina Picó Segura¹, Jill A. McKay², Juana Sánchez Roig¹, Teresa Priego Cuadra¹, John C. Mathers² y Andreu Palou Oliver¹

¹Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (Nutrigenómica), Universidad de las Islas Baleares y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Palma de Mallorca, ²Human Nutrition Research Centre, Institute for Ageing and Health, Newcastle University, Newcastle upon Tyne (UK)

La suplementación con leptina en ratas durante la lactancia protege contra el desarrollo de obesidad en la edad adulta y mejora el control de la ingesta. Esto se asoció con cambios en la expresión de genes hipotalámicos implicados en la acción central de la leptina: la proopiomelanocortina (*Pomc*), el receptor de la leptina (*Lepr*) y el supresor de la señalización por citoquinas 3 (*Socs3*). Nuestro objetivo fue determinar el estado de metilación en los promotores de estos genes y evaluar si los cambios observados en la expresión génica de dichos genes se podrían explicar por cambios en su metilación. Se administró diariamente una dosis fisiológica oral de leptina o el vehículo a ratas macho durante la lactancia. Tras el destete, los animales fueron alimentados con una dieta normolipídica o con una dieta hiperlipídica (HF) hasta los 6 meses de edad. Se extrajo el DNA del hipotálamo y se analizó la metilación de regiones promotoras de los genes mediante pirosecuenciación. La metilación en el promotor del *Pomc* aumentó tras una dieta HF en los controles, mientras que disminuyó en los animales tratados con leptina. Además, se encontró una correlación entre la metilación del DNA y los niveles de mRNA del *Pomc* ($p=0,075$). No se observaron cambios significativos en la metilación de las islas CpG de las regiones promotoras estudiadas para el *Lepr* y *Socs3* en respuesta al tratamiento con leptina durante la lactancia o a la alimentación con la dieta HF. Por tanto, se evidencia por primera vez que el tratamiento con leptina durante la lactancia programa cambios en el estado de metilación de un gen hipotalámico implicado en el control de la ingesta en ratas alimentadas con una dieta HF, con posibles implicaciones en la expresión génica y la protección contra el desarrollo de obesidad.

P07-2

La Neuregulina-1 mejora la sensibilidad a la insulina en ratas diabéticas ZDF

Iliana López-Soldado Fernández, Vicente Martínez-Redondo, Katrin Niisuke y Anna Gumá

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia Universitat de Barcelona ,
Barcelona*

La neuregulina (NRG) es un factor de crecimiento que pertenece a la familia del Factor Epidermal de Crecimiento (EGF). Se une a los receptores tirosina quinasa ErbB3 y ErbB4. En el músculo esquelético adulto las NRG inducen la captación de glucosa a través de la translocación de GLUT4 a las membranas de superficie, de una manera análoga a la insulina y el ejercicio. El tratamiento crónico con NRG mejora la sensibilidad a la insulina en cultivos de miocitos L6E9 y C2C12. Por tanto es relevante estudiar los efectos del tratamiento in vivo con NRG en la rata diabética Zucker (ZDF), mediante el análisis de la sensibilidad a la insulina y determinación de los tejidos diana que pudieran contribuir a la homeostasis de la glucemia, estudiando la posible interacción entre la vía de acción de la NRG y la de la insulina. Para ello se inyectó i.p NRG recombinante (rNRG) que contiene el dominio bioactivo EGF (25 mg/Kg), o bien salino, a ratas controles y diabéticas, y 15 minutos después se realizó un test de tolerancia a la glucosa. Se extrajo sangre a diferentes tiempos después de la inyección de NRG (0,15, 30, 45, 75 y 135 minutos) para medir la glucosa e insulina. En respuesta a la administración de glucosa, las ratas controles tratadas con NRG mostraron una significativa reducción del pico de insulinemia, mientras que las ratas ZDF, donde las insulinemias ya son extremadamente altas, la NRG redujo significativamente el pico de glucemia. Estos datos sugerían una mejora en las acciones de la insulina. Los estudios en músculo esquelético e hígado indican que la vía de señalización de la insulina se ve potenciada por la NRG. Por tanto, estos resultados abren las puertas a futuros estudios para el uso de la NRG como herramienta terapéutica en situaciones de resistencia a la insulina.

P07-3

Los ácidos grasos *trans* ingeridos por la rata preñada durante la primera mitad de la gestación son accesibles a sus crías durante la etapa perinatal

Encarnación Amusquivar Arias, Jamie Clayton y Emilio Herrera Castellón

Facultades de Farmacia y Medicina. Universidad CEU San Pablo, Boadilla del Monte

En la primera mitad de la gestación el tejido adiposo de la madre deposita los ácidos grasos de la dieta, que se movilizan al final de la gestación. Se conoce que los ácidos grasos *trans* (AG_t) alteran el perfil de PUFA y afectan el desarrollo postnatal. En nuestro laboratorio se demostró que los AG_t de la dieta durante la primera mitad de la gestación en la rata se acumulan en tejido adiposo materno. Para determinar si los AG_t ingeridos en la primera mitad de la gestación son accesibles al feto en los últimos días de vida intrauterina y al lactante, se alimentaron ratas desde el inicio de la gestación con dietas semisintéticas que contenían un 10% de aceite de oliva (grupo O), o un 8% de aceite de cacahuete hidrogenado (rico en AG_t) y un 2 % de aceite de oliva (grupo C) durante los 12 primeros días de gestación. A partir del día 13 ambos grupos pasaron a tomar la misma dieta estándar. Animales de cada grupo y su descendencia se estudiaron a día 20 de gestación (G) y a días 1 y 6 de lactancia (L). Se encontró mayor concentración de triglicéridos plasmáticos en las madres a día 20G en el grupo C frente al O y lo mismo ocurría en la concentración de los distintos ácidos grasos en plasma. A día 1L la tendencia era la contraria, siendo mayor la concentración de triglicéridos y la de cada uno de los ácidos grasos en el grupo O, igualándose las diferencias a día 6L. Además, se detectó la presencia de AG_t en plasma, hígado, tejido adiposo y glándula mamaria. También se detectó en el grupo C la presencia de AG_t en plasma de fetos y crías los mismos días que sus madres. En conclusión, los AG_t ingeridos durante la primera mitad de la gestación y acumulados en tejido adiposo de madre, se movilizan alrededor del parto, y se hacen asequibles al feto y al neonato.

P07m-4

Cambios en la actividad de la hexosaminidasa a lo largo de la gestación y su modulación por PPAR γ

Julio Sevillano¹, María Gracia Sánchez Alonso¹, Diego Moreno Ruiz¹ y María del Pilar Ramos Álvarez²

¹Area de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Boadilla del Monte, Madrid, ²Area de Fisiología, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Boadilla del Monte, Madrid

La N-acetil-beta-glucosaminidasa (hexosaminidasa, HEX) es una exoglucosidasa que libera residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina de glucoproteínas,

glucolípidos y glucosaminoglicanos. La HEX presenta distintas isoformas con diferente estabilidad térmica. Las isoformas termolábiles (TL) son la HEX A y HEX S, y las termoestables (TE) son la HEX B y la placentaria (HEX P). Aunque los estudios son escasos, la HEX se ha propuesto como un marcador de inflamación con valor clínico en diversas enfermedades, entre las que se incluye la diabetes. Dado que la gestación es una situación que cursa con inflamación y resistencia a la insulina, quisimos estudiar la actividad HEX total y la de sus isoformas, en la gestación y la lactancia. Asimismo, analizamos si el tratamiento de ratas gestantes de 20 días con un antidiabético agonista de PPAR γ (pioglitazona), modifica la actividad HEX.

La actividad HEX circulante aumentó progresivamente a lo largo de la gestación, decayendo tras el parto. Dicha actividad fue más alta tras un ayuno prolongado y correlacionó con los FFA. A nivel tisular la HEX aumentó en hígado, placenta y glándula mamaria a lo largo de la gestación, siendo la actividad más elevada en el último tercio de la misma, y disminuyendo tras el parto. Por el contrario, al final de la gestación la actividad HEX se encontró disminuida en tejido adiposo. Mientras que en hígado y placenta las isoformas mayoritarias fueron las TE, en tejido adiposo y glándula fueron las TL. En las ratas gestantes tratadas con pioglitazona, disminuyó la actividad HEX en plasma, en tejido adiposo y en glándula mamaria, lo cual podría indicar un posible papel modulador del PPAR γ .

se caracterizan por cambios en la expresión de AQP7 modulados por la respuesta tisular a la insulina. Para ello analizamos por Western-blot y RT-PCR la expresión de AQP7 en la GM de ratas vírgenes y gestantes a distintos días de gestación), así como en madres lactantes de 3 días con y sin crías. La localización de la proteína en el tejido se analizó por inmunohistoquímica. Nuestros resultados confirmaron que AQP7 se localiza mayoritariamente en los capilares, y que su expresión disminuye durante la gestación y aumenta durante la lactancia, bloqueándose este efecto con la retirada de las crías. Para ahondar en el papel de la sensibilidad a la insulina en la expresión de AQP7, tratamos ratas del día 16 al 20 de gestación con 15 o 45 mg de pioglitazona /kg., un antidiabético agonista de PPAR- γ . La sensibilidad a la insulina fue mayor en las madres tratadas con el antidiabético que en las controles. En estas condiciones la expresión de AQP7 disminuyó de forma dosis-dependiente, de forma paralela a un aumento en la acumulación de lípidos en el tejido.

Nuestros resultados sugieren que AQP7 podría jugar un papel relevante en las adaptaciones metabólicas de la GM favoreciendo la acumulación de triglicéridos al final de la gestación y su movilización a la leche durante la lactancia.

Nota: Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (SAF2010- 19603).

P07-5

Modulación de la aquoporina-7 en la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia: implicación de la sensibilidad a la insulina

María Haro García¹, Izabela Prokop¹, Justyna Marciniak¹, M. Rosario Rodríguez Ramos², Judith Cacho Herrero³, Julio Sevillano Fernández¹ y M. del Pilar Ramos Álvarez¹

¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, ²Área de Biología Celular, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, ³Área de Fisiología, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Madrid

La aquaporina-7 (AQP7) es un canal de glicerol esencial para el metabolismo tisular de los triglicéridos. En estudios previos hemos mostrado que una aumentada sensibilidad a la insulina en la glándula mamaria (GM) al final de la gestación contribuye a la acumulación de triglicéridos en este tejido en preparación de la lactancia. El objetivo de nuestro estudio fue establecer si la gestación y la lactancia

P07-6

Presencia de AFABP en el plasma del cordón umbilical: Estudio en mujeres gestantes controles y con diabetes gestacional a término y sus neonatos

Henar Ortega-Senovilla¹, Ute Schaefer-Graf², Katrin Meitzner² y Emilio Herrera Castellón¹

¹Dpto. Biología. Facultades Farmacia y Medicina. Univ. San Pablo CEU. Madrid, Madrid, ²Hospital of St. Joseph. Obstetrics and Gynecology, Berlin (Germany)

Recientemente se ha descrito la presencia en la circulación de AFABP (adipocyte fatty acid binding protein). Su función se desconoce, pero en plasma de adultos se correlaciona positivamente con resistencia a la insulina y con diabetes tipo 2. Puesto que no había datos de AFABP en mujeres gestantes a término (GT), nos planteamos analizar la presencia de AFABP en el suero de un grupo control (n=86) de GT y sus neonatos (suero arterial de cordón umbilical, CU), y compararlo con el de un grupo (n=98) de GT afectadas de diabetes gestacional (GT-DG) y sus neonatos. En el grupo de GT-DG, la concentración de insulina, el HOMA y la relación insulina/glucosa, así como

la de RBP4 fue mayor que en el grupo control, pero la de adiponectina fue menor. Por su parte, en el CU la insulina, la glucosa, el HOMA, el cociente insulina/glucosa, la RBP4, los NEFAs y glicerol fue superior en el grupo nacido de GT-DG que en el grupo control; e igual que en las madres, la concentración de adiponectina fue menor en el CU del grupo de DG vs el control. Tanto en el suero de las GT-DG como en el de sus CU, detectamos la presencia de AFABP. Pero mientras que en las madres, la concentración fue mayor en suero de GT-DG que en controles ($17,7 \pm 0,8$ vs $19,9 \pm 1,0$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,05$), en el suero del CU hubo menor concentración en el grupo nacido de DG que de controles ($29,1 \pm 1,4$ vs $20,8 \pm 1,5$ ng/ml respectivamente, $p < 0,001$). No hubo correlación entre AFABP y marcadores de resistencia a la insulina, pero sí con los de adiposidad. En conclusión, demostramos por primera vez la presencia de AFABP en suero de cordón umbilical, y que sus niveles en madres gestantes no se relacionan directamente con sus índices de resistencia insulínica.

P07e-7

Efectos de la subnutrición de la madre durante la primera mitad de la gestación sobre la expresión de enzimas del metabolismo hepático en sus crías

María Limones Cornejo, Julio Sevillano Fernández, Emilio Herrera Castellón y María del Pilar Ramos Álvarez

Área de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Farmacia y Medicina, Universidad San Pablo-CEU, Boadilla del Monte, Madrid

Recientemente hemos demostrado que la subnutrición de la madre durante la primera mitad de la gestación favorece la acumulación de lípidos hepáticos y acelera el deterioro de la respuesta a la insulina en los descendientes en la edad adulta, en una forma dependiente del sexo. Para estudiar si la malnutrición intrauterina puede afectar la expresión de enzimas hepáticas en el periodo perinatal, desde el día 0 hasta el 12 de gestación, un grupo de ratas se alimentó ad libitum (madres controles, MC) y otro grupo se alimentó con el 60% de lo ingerido por las MC (madres subnutridas, MS). Desde el día 12 todos los animales se alimentaron ad libitum. En el hígado de los fetos de 20 días y en los neonatos de 1 día se determinó la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico y glucídico.

Los neonatos de 1 día nacidos de MS pesaron menos que los de MC. En la transición de la vida intrauterina a la vida extrauterina, se produjo una disminución en la expresión de la acetilCoA carboxilasa y de la ácido graso sintasa en los

neonatos de MC que no se detectó en los neonatos de MS. Asimismo, la inducción de la expresión de enzimas gluconeogénicas (PEPCK, glucosa 6-fosfatasa), fue más baja en los neonatos nacidos de MS que en los de MC. En comparación con las de MC la expresión de la CPT1, piruvato deshidrogenasa y del factor de transcripción CEBP- α fue menor en las crías nacidas de MS. En conjunto, nuestros resultado sugieren que la subnutrición de la madre durante la primera mitad de la gestación compromete el crecimiento fetal, y altera la expresión de algunas de las enzimas implicadas en las adaptaciones metabólicas que tienen lugar en la transición de la vida fetal a la extrauterina. Estas adaptaciones podrían tener consecuencias a largo plazo en la etapa adulta.

P08. Bioquímica y Biología Molecular de Plantas

P08-1

Análisis transcriptómico y proteómico en plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes en isoformas de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

Mauricio Soto Suárez, José Antonio Rojas González, Antonio Jesús Serrato Recio y Mariam Sahrawy Barragán

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada

Durante la fotosíntesis, las triosas fosfato, formadas en el Ciclo de Calvin, pueden ser utilizadas para la formación de almidón en el cloroplasto o transportadas al citoplasma para la síntesis de sacarosa. Las isoformas cloroplastídica (cpFBPasa) y citosólica (cyFBPasa) de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa catalizan el primer paso irreversible de la biosíntesis de almidón o sacarosa, siendo estas enzimas claves en el mantenimiento del balance almidón/sacarosa en la célula. El objetivo de este estudio es identificar y caracterizar los genes/proteínas diferencialmente expresados en mutantes *knock-out* de las FBPasas de *Arabidopsis* para entender mejor el control del balance almidón/sacarosa. Para ello, microarrays con el genoma de *Arabidopsis* fueron híbridos comparando ADNc de mutantes cpFBPasa y cyFBPasa con ADNc de *Arabidopsis* Col-0. Extractos de proteínas fueron preparados para

comparar mutantes y plantas silvestres usando 2D-PAGE. Los análisis del transcriptoma revelan que más del 3% de los genes del genoma están diferencialmente expresados en tejidos fototrópicos y heterotróficos en ambos mutantes con respecto a plantas silvestres. Entre las categorías funcionales mejor representadas están los genes asociados con el metabolismo de carbohidratos, regulación génica y respuesta a estrés. Los análisis de 2D-PAGE en tejidos fototróficos muestran un total de 40 y 25 proteínas diferenciales en los mutantes cpFBPasaI y cyFBPasa, respectivamente. Estas proteínas fueron identificadas mediante MS-MS/MS (MALDITOF-TOF). Nuestra investigación puede generar importante información para la evaluación y selección de genes candidatos cuyos cambios de expresión conduzcan a un aumento en la producción y calidad de los azúcares (sacarosa y almidón) en plantas de interés agronómico.

P08-2

Caracterización de las actividades enzimáticas de la RIP de la remolacha azucarera betina 27: N-glicosidasa, topoisomerasa y antifúngica

Rosario Iglesias Alvarez, Lucía Citores González y José Miguel Ferreras Rodríguez

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, Valladolid

Las RIP (proteínas inactivadoras de ribosomas) son proteínas presentes en muchas plantas que inhiben irreversiblemente la síntesis proteica en la etapa de elongación. Se clasifican en función de su estructura en RIP de tipo 1, constituidas por una cadena polipeptídica con actividad N-glicosidasa y RIP de tipo 2 formadas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena A con actividad enzimática y una cadena B que es una lectina. Betina 27 (B27) es una RIP de tipo 1, que se sintetiza en la remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*) en respuesta a infecciones víricas y fúngicas. En este trabajo se aborda la caracterización de las distintas actividades enzimáticas de esta proteína multifuncional: N-glicosidasa, topoisomerasa y actividad antifúngica. B27 depurina específicamente los ribosomas de mamíferos, bacterias, hongos y plantas y multidepurina el RNA del virus del mosaico del tabaco. B27 actúa también sobre el DNA, presentando dos tipos distintos de actividades: N-glicosidasa sobre el DNA de esperma de salmón, y topoisomerasa sobre el DNA plasmídico. Además, BE27 tiene actividad antifúngica frente a *Penicillium digitatum*, un hongo que provoca la podredumbre de los cítricos, causando importantes pérdidas

económicas. Los resultados obtenidos indican claramente un fuerte efecto inhibitorio de B27 sobre el crecimiento de *P. digitatum* en cultivo, tanto durante la germinación de las esporas, como sobre el desarrollo de micelio, que podría correlacionarse con la actividad N-glicosidasa de B27 sobre los ribosomas.

P08-3

Activación de la autofagia en ausencia o deficiencia de carotenoides

María Esther Pérez Pérez, Inmaculada Couso Liañez y José Luis Crespo

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla

La autofagia es un proceso catabólico gracias al cual la célula recicla parte de su material interno en condiciones de estrés. Este proceso se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, que engloban el material que finalmente será degradado en la vacuola o lisosoma. La proteína ATG8 desempeña una función esencial en la formación de autofagosomas y se ha utilizado como marcador molecular de autofagia en diferentes organismos. Nuestro laboratorio ha caracterizado molecularmente este proceso en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, demostrando que la proteína CrATG8 está conservada funcionalmente y que puede ser empleada como marcador de autofagia [1,2]. En este estudio se ha investigado la activación de la autofagia en ausencia de carotenoides, esenciales para la protección frente al daño oxidativo en organismos fotosintéticos. Para ello, se han analizado los niveles de CrATG8 en células tratadas con norflurazón, herbicida que inhibe la primera enzima (fitoeno desaturasa) de la ruta de biosíntesis de carotenoides, así como en mutantes de *Chlamydomonas* carentes de otras enzimas implicadas en dicha ruta. Además, se ha determinado el nivel de autofagia en células de *Chlamydomonas* sometidas a estrés oxidativo por la adición de diferentes oxidantes tales como peróxido de hidrógeno o metil viológeno. Nuestros resultados indican que la ausencia de carotenoides y el consiguiente aumento en la producción de ROS intracelular, provocan la activación de la autofagia para la adaptación celular a estas condiciones de estrés.

[1] Pérez-Pérez ME *et al.* *Plant Physiol* 2010; 152 (4): 1874-88.

[2] Pérez-Pérez ME, Crespo JL. *Autophagy* 2010; 6 (4): 562-3.

P08-4

Caracterización de una aspartilendopeptidasa recombinante proveniente de cardo negro (*Cirsium vulgare*) en su forma zimogénica

Daniela Lufrano¹, Rosario Faro², Sandra Vairo Cavalli¹, Isaura Simões³, Pedro Castanheira³ y Carlos Faro³

¹LIPROVE, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (Argentina), ²Centro de Neurociências e Biología Celular de Coimbra (CNC), Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal), ³Biocant-Biotechnology Innovation Center, Molecular Center, Molecular Biotechnology Unit, Cantanhede (Portugal)

Las proteasas del tipo pepsina (familia A1) de plantas son endopeptidasas activas a pH ácido, sintetizadas como preproteasas y usualmente secretadas en forma inactiva. El propéptido se ha asociado con direccionamiento vacuolar, modulación de la actividad del precursor y plegamiento proteico. Las características del propéptido y de la primera porción del dominio N-terminal han cobrado interés en el estudio del mecanismo de activación de los diferentes tipos de proenzimas. El objetivo del trabajo consiste en caracterizar el zimógeno de cirsina, aspartilproteasa de flores del cardo *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. (Asteraceae) y relacionar el rol del propéptido con la inactivación del precursor como ha sido sugerido para profitepsina de cebada. Se aisló RNA total de flores inmaduras con un kit comercial. Luego de la retrotranscripción, se amplificó la secuencia del zimógeno mediante primers diseñados a partir de regiones altamente conservadas de los extremos del marco de lectura abierta de las proteasas aspárticas de Asteraceae. El amplicón se clonó en un vector pGEM-Teasy y subclonó sin la región pre entre los sitios XhoI y NheI del vector de expresión pET-23d utilizando primers específicos para *C. vulgare*. El precursor de cirsina fue expresado en *E. coli* BL21 Star y recuperado de la fracción insoluble como cuerpos de inclusión. Se purificó por exclusión molecular seguido de intercambio aniónico. Se determinó la actividad proteolítica de la proteína purificada frente al sustrato fluorogénico (MCA)KKPAEFFALK(DNP). Los resultados obtenidos muestran que el precursor de cirsina es activo sugiriendo que el mecanismo de inactivación del mismo difiere del de fitepsina a pesar de la presencia de los residuos Lys11 y Tyr 13 que han sido asociados a esa función.

P08-5

TOR controla el estado de fosforilación de la chaperona BiP en *Chlamydomonas reinhardtii*

Sandra Díaz-Troya¹, M. Esther Pérez-Pérez¹, Marta Pérez-Martín¹, Suzette Moes², Paul Jenó², Francisco J. Florencio¹ y José Luis Crespo¹

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Universidad de Sevilla y CSIC. cicCartuja, Sevilla,

²Biozentrum, University of Basel, Basel (Switzerland)

La quinasa TOR (*Target Of Rapamycin*) integra señales nutricionales y de estrés para controlar de forma coordinada el crecimiento celular en eucariotas. TOR se asocia con otras proteínas conservadas para constituir dos complejos de señalización denominados TORC1 y TORC2. En la mayoría de organismos eucariotas, la inactivación del complejo TORC1 por rapamicina regula negativamente la síntesis de proteínas. Tanto la quinasa TOR como componentes del complejo TORC1 se encuentran conservados en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* [1,2]. Nuestro estudio demuestra que la inhibición por rapamicina de la ruta de señalización TOR en *Chlamydomonas* provoca una marcada fosforilación de la chaperona BiP localizada en el retículo endoplasmático. Por el contrario, la modificación de BiP por fosforilación se suprime cuando las células se encuentran bajo condiciones en las que se requiere su actividad chaperona, tales como el estrés térmico o el tratamiento con tunicamicina. Así mismo, se ha identificado un fosfopéptido localizado en el dominio de unión al sustrato de BiP en células tratadas con rapamicina. Este péptido contiene un residuo de treonina altamente conservado que podría regular la función de la chaperona BiP, como demuestran ensayos funcionales realizados en levadura. Por tanto, nuestros resultados revelan un mecanismo de regulación de la chaperona BiP en *Chlamydomonas* por procesos de fosforilación / desfosforilación y asignan un papel a la ruta de señalización TOR en el control de la modificación de BiP.

[1] Crespo *et al.* *Plant Physiol* 2005; 139: 1736-49.

[2] Díaz-Troya *et al.* *Eukaryot Cell* 2008; 7: 212-2.

P08-6

Las isoformas cloroplastídica y citosólica de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) son clave en la formación y distribución de los carbohidratos en plantas de *Arabidopsis*

José Antonio Rojas González, Antonio Jesús Serrato Recio, Mauricio Soto-Suárez, Ángel García Díaz, María Romero-Puertas, Luisa María Sandalio González, Ana Chueca Sancho y Mariam Sahrawy Barragán

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada

Durante la fotosíntesis, la sacarosa y el almidón son los productos finales de la fijación del CO₂ gracias al ciclo de Calvin. En este proceso las isoformas fructosa-1,6-bisfosfatasa (FPasas) ocupan una posición clave. El enzima FBPasa cataliza la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato y Pi. En la actualidad se han descrito tres FBPasas de plantas, dos en el cloroplasto y una en el citosol. La isoforma citosólica (cyFBPasa) participa en la síntesis de sacarosa y regulada por FBP y AMP. En el cloroplasto, la isoforma cpFBPsal está implicada en la formación de almidón, y es activada por reducción de puentes disulfuro de su dominio redox vía tioredoxinas (TRX). Una nueva isoforma del cloroplasto, cpFBPasaII, no contiene en su secuencia el dominio redox y es resistente a la inactivación por H₂O₂. Mediante la caracterización de dos mutantes de *Arabidopsis* con pérdida de función en los enzimas cyFBPasa y cpFBPasaI hemos estudiado el papel de estas proteínas en la distribución de los carbohidratos en plantas. El mutante cpFBPasaI (CI) presenta el tamaño más reducido en relación con la planta silvestre así como una menor tasa fotosintética pero un mayor contenido de sacarosa en sus hojas. Los cloroplastos del mutante cyFBPasa (Cy) muestran un mayor número de gránulos de almidón. La línea mutante cpFBPasaII (CII) que sobreexpresa la proteína cpFBPasaII presentó un tamaño de hojas mayor que el control. El aporte exógeno de azúcares induce una recuperación del fenotipo silvestre. Se analizan varios parámetros fisiológicos así como algunos antioxidantes. Los resultados obtenidos apuntan a que esta estrategia biotecnológica de modificación del contenido de azúcares permitiría generar cultivos de interés agronómico o industrial con mayor producción y calidad.

P08-7

The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation

Luis Sanz Andreu¹, Walter Dewitte² y James Murray²

¹Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Cardiff University, Cardiff (UK)

The integration of cell division in root growth and development requires mediation of developmental and physiological signals through regulation of cyclin-dependent kinase activity. Cells within the pericycle form de novo lateral root meristems, and D-type cyclins (CYCD), as regulators of the G₁-to-S phase cell cycle transition, are anticipated to play a role. Here, we show that the D-type cyclin protein CYCD2;1 is nuclear in *Arabidopsis thaliana* root cells, with the highest concentration in apical and lateral meristems. Loss of CYCD2;1 has a marginal effect on unstimulated lateral root density, but CYCD2;1 is rate-limiting for the response to low levels of exogenous auxin. However, while CYCD2;1 expression requires sucrose, it does not respond to auxin. The protein Inhibitor-Interactor of CDK/Kip Related Protein2 (ICK2/KRP2), which interacts with CYCD2;1, inhibits lateral root formation, and *ick2/krp2* mutants show increased lateral root density. ICK2/KRP2 can modulate the nuclear levels of CYCD2;1, and since auxin reduces ICK2/KRP2 protein levels, it affects both activity and cellular distribution of CYCD2;1. Hence, as ICK2/KRP2 levels decrease, the increase in lateral root density depends on CYCD2;1, irrespective of ICK2/CYCD2;1 nuclear localization. We propose that ICK2/KRP2 restrains root ramification by maintaining CYCD2;1 inactive and that this modulates pericycle responses to auxin fluctuations.

Sanz L *et al.* *Plant Cell* 2011; 23 (2):641-60.

Sanz L *et al.* *Progress in Botany* (in press, 2011).

P08m-8

Purificación y caracterización de deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

Bouchra Elkhalfi¹, Aurelio Serrano Delgado² y Abdelaziz Soukri¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Ain Chock (Marruecos),

²Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, Sevilla

Pseudomonas syringae pv. tomato causa frecuentemente una enfermedad en el tomate llamada técnicamente mancha bacteriana. Pero su mecanismo de infección sigue siendo muy poco conocido. Recientes estudios de biología molecular, genómica y proteómica, han permitido conocer que esta bacteria produce una serie de componentes celulares de naturaleza proteínica que promueven la infección y reducen los elementos nutritivos en el tomate. Estas proteínas incluyen la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Hemos purificado y caracterizado, el GAPDH citosólica NAD⁺ dependiente, una enzima clave del metabolismo de carbono, de *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 tomate, y sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas fueron investigadas. El método de purificación consistió en dos pasos, el fraccionamiento de sulfato de amonio seguido por Blue Sepharose CL-6B cromatografía. El peso molecular de la enzima purificada se determinó por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida. Esta proteína purificada se utilizará para la producción de un anticuerpo monoespecífico que ayudará a reducir la patogenicidad de *Pseudomonas syringae*. **Palabras claves:** *Pseudomonas syringae*, GAPDH, purificación, anticuerpos, patogenicidad.

P08-9

Estudio de la resistencia a patógenos mediada por ácido gentísico en plantas

Pablo Granell Albert, Mayte Castellano Pérez, Purificación Lisón Párraga, Susana Tárraga Herrero, Ismael Rodrigo Bravo, M^a Pilar López Gresa, José M^a Bellés Albert y Vicente Conejero Tomás

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Valencia

Estudios realizados con diferentes sistemas planta-patógeno que establecen una interacción compatible han podido constatar la acumulación de ácido gentísico (GA) en las plantas infectadas. Además, aplicaciones exógenas de este compuesto inducen respuestas defensivas diferentes a las mediadas por ácido salicílico (SA), por lo que el ácido gentísico se perfila como una molécula señalizadora complementaria al ácido salicílico en infecciones compatibles.

En este trabajo se llevaron a cabo tratamientos exógenos con SA, GA de plantas de tomate 'Rutgers' y de *Gynura aurantiaca*. Posteriormente, se infectaron las plantas de tomate y de *Gynura* con el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV) y con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd), respectivamente. En ambos casos se realizó un seguimiento de la infección con objeto de estudiar un

posible retraso de la aparición de los síntomas. En las plantas de tomate se observó una disminución en la acumulación de la proteína de la cápside del virus como consecuencia de los tratamientos con SA o GA. Del mismo modo, en plantas de *Gynura aurantiaca* se observó un retraso en la aparición de los síntomas en aquellas tratadas con SA o GA. Así pues, nuestros resultados indican que el GA induce cierta resistencia a infecciones de tipo compatible en plantas.

Para estudiar las bases moleculares de esta resistencia, se buscaron en tomate los genes ortólogos a los relacionados con el silenciamiento de RNA en *Arabidopsis thaliana*, tales como las RNA polimerasas-RNA dirigidas (RdRp) o las endorribonucleasas *Dicer-like* (DCL) y se realizó el seguimiento de la inducción de los mismos por infecciones virales y viroidales. Posteriormente, se analizó su activación transcripcional inducida por GA o SA.

P08-10

Estudio de la actividad in vivo de la gentisato-glicosiltransferasa de tomate GAGT mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*

Laura Campos Beneyto, Purificación Lisón Párraga, Ismael Rodrigo Bravo, M^a Pilar López Gresa, José M^a Bellés Albert y Vicente Conejero Tomás

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Valencia

El ácido salicílico (SA) juega un papel fundamental en la respuesta defensiva de las plantas. Se acumula en las mismas como consecuencia de interacciones incompatibles y su aplicación exógena induce resistencia. Por otra parte, en nuestro laboratorio se identificó el ácido gentísico (GA, ácido 2,5-dihidroxi benzoico), que se acumula en infecciones compatibles no necrotizantes. Su aplicación exógena induce un conjunto de proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) distintas a las que induce el SA, por lo que podría tener un papel complementario en la señalización frente a patógenos en plantas. Tanto SA como GA se acumulan en forma de glicósidos. Las reacciones de conjugación consisten en la unión de una o varias moléculas de azúcar al metabolito en cuestión, y son catalizadas por glicosiltransferasas. En plantas de tomate, el SA se acumula como SA 2-O- β -glucósido, mientras el GA lo hace en forma de GA 5-O- β -xilósido. En publicaciones previas hemos descrito GAGT (*Gentisic Acid Glycosyl Transferase*) como la proteína que conjuga GA en tomate. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la sobreexpresión de GAGT mediante experimentos de expresión transitoria. El cDNA de GAGT ha sido clonado en el plásmido binario *pGWB8* (GATEWAY), que posee el

promotor constitutivo 35S de CaMV y una cola de histidinas en su extremo C-t. Posteriormente, se ha realizado la agroinfiltración de dicha construcción en hojas de *N. benthamiana*. Los niveles de transcrito y proteína se determinaron por RT-PCR y Western Blot, respectivamente. Para el estudio de la actividad in vivo, las plantas agroinoculadas se embebieron en soluciones de GA o SA, y posteriormente se analizaron los niveles libres y conjugados de dichos fenólicos mediante HPLC.

P08-11

Un sistema de chaperonas y proteasas cloroplastídicas regula los niveles y la actividad de DXS, el primer enzima de la ruta del MEP

Pablo Pulido y Manuel Rodríguez Concepción
Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), Barcelona

DXS es el primer enzima de la ruta del MEP y constituye uno de los puntos principales de regulación de la ruta, existiendo una buena correlación entre los niveles de DXS y los de isoprenoides plastídicos como carotenoides y clorofilas. DXS está sometida a una fuerte regulación postranscripcional. Recientemente, nuestro grupo ha propuesto la implicación del complejo Clp proteasa en la degradación de DXS, que se acumula en el mutante de *Arabidopsis thaliana* deficiente en una de las subunidades catalíticas del complejo, ClpR1.

Actualmente, hemos caracterizado mutantes para las posibles subunidades reguladoras del complejo observando que DXS se acumula exclusivamente en ausencia de ClpC1. Con el objetivo de encontrar proteínas que pudieran reconocer y dirigir DXS a degradación, realizamos estudios de doble híbrido identificando DXI1 (*DXS-interacting factor 1*). El mutante *dxil* acumula DXS inactiva y, por tanto, muestra mayor sensibilidad a clomazona (CLM), un inhibidor específico de DXS. DXI1 posee un dominio J que se ha descrito interacciona con la chaperona Hsp70. Las proteínas J unen y transportan sustratos que han perdido su conformación nativa siendo el factor que da especificidad al sistema. Se ha observado que la interacción de Hsp70 con otra chaperona, ClpB, ejerce un efecto sinérgico sobre el sistema. Mutantes para isoformas cloroplastídicas de Hsp70 y ClpB mostraron una mayor sensibilidad a CLM. De hecho, ClpC1 y ClpB pertenecen a la misma familia de cochaperonas cloroplastídicas, con la diferencia principal de que ClpC1 posee un dominio de unión a las subunidades catalíticas del complejo Clp proteasa. Por tanto, proponemos un modelo en el cual DXI1 reconoce a DXS y la dirige bien a replegarla vía Hsp70/ClpB o bien a degradación vía Hsp70/ClpC1.

P08-12

Utilización de herramientas proteómicas para el screening de inhibidores de proteasas obtenidos a partir de diversas plantas de Sudamérica

David W. Obregón¹, Sebastian Tanco², Mariana Tellechea¹, Sebastián Cisneros¹, María Laura Colombo¹, Florencia Ceccacci¹, Julia Lorenzo², Nora Priolo¹ y Francesc Xavier Avilés²

¹*Facultad de Ciencias Exactas/LIPROVE, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (Argentina),* ²*Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB, Cerdanyola*

En los últimos años, en la investigación fitoquímica se han incorporado nuevas tecnologías para la identificación de nuevas moléculas con aplicación en biomedicina y biotecnología. Entre estas se encuentran los inhibidores de proteasas (IP) que en las plantas, frecuentemente están presentes en altas cantidades y pueden actuar como proteínas de reserva o como elemento de defensa. En este trabajo se ha utilizado como método de detección de IP la tecnología del Intensity Fading MS, técnica de *High-throughput screening* que permite realizar un *screening* rápido para la identificación de moléculas a partir de extractos complejos. Esta metodología nos ha permitido identificar IP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales. En este trabajo se aislaron, purificaron y caracterizaron nuevos inhibidores de proteasas a partir de distintas fuentes vegetales. Se utilizaron tubérculos de *S. tuberosum L.*, y también se investigaron tubérculos de otras familias tales como *U. tuberosus*, *O. tuberosa*, *S. tuberosum* variedad *desireé*, semillas de *A. hortorum*, *A. angustifolia*, *Q. robur*, y *C. scoparius*. A los extractos crudos (EC) se les determinó actividad inhibitoria de Tripsina, Carboxipeptidasa A, Papaína y Subtilisina. Posteriormente los EC fueron pasados por matrices de afinidad conteniendo las proteasas blanco inmovilizadas. Los inhibidores eluidos se detectaron por Intensity fading MS, identificándose así los IP mediante atenuación de la intensidad de la señal de los péptidos buscados. Mediante cinética de inhibición y confirmando con IF-MALDI-TOF se vieron moléculas de pesos moleculares de 4,2 y 21 KDa retenidas en microcolumnas de CPA y tripsina inmovilizadas, valores esperados para este tipo de inhibidores.

P08-13

Insights in maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches

Imen Amara, Eliandre Olivera, Montserrat Pagès y Adela Goday

Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), Barcelona

LEA (late embryogenesis abundant) proteins participate (are associated) in the stress tolerance response in plants but the mechanisms by which protection occurs are not fully/well understood (are still unclear). In the present work we analyze by mass-spectrometry the LEA proteome from maize mature/dry embryos obtained by a fractionation procedure that enriches in unfolded/disordered proteins. Twenty-three embryo proteins were identified and among them thirteen corresponded to LEA-type proteins. In order to gain insights into LEA protein functions we selected three major LEA proteins, Emb564, Rab17 and Mlg3, belonging to groups 1, 2 and 3, respectively and carried out a comparative study /compared different aspects. First, posttranslational modifications (PMTs) in embryo proteins and protein expression in vegetative tissues under abiotic stress we analyzed. Second, by using recombinant proteins, the antiaggregation properties of the three LEA proteins we evaluated *in vitro*. Third, the protective features/effects of the proteins were evaluated/assessed in living cells under stress, in bacterial growth and in *N. bentamiana* epidermal cells agroinfiltrated with fluorescent LEA-GFP fusions. A degree of correlation exists in what observed *in vitro* and *in vivo* assays. Protein visualization by confocal microscopy indicated that fluorescent Rab17-GFP protein co-localized to leaf oil bodies after heat shock and that cells expressing Mlg3-GFP protein showed reduced cell shrinkage/volume effects during dehydration. The results indicate differences in specificity and suggests functional diversity among maize LEA groups.

P08-14

Understanding drought in maize: characterization of ZmSnRK2.8 and its interactors

Belmiro Vilela, Elena Nájjar, Alicia Moreno, Montserrat Pagès y Victoria Lumbreras

Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), Barcelona

Abscisic acid (ABA) is an important plant hormone involved in the response to several environmental stimuli and is critical for the regulation of various plant processes namely abiotic and biotic stress tolerance. SnRK2 (sucrose

non-fermenting 1-related protein kinases 2) proteins are plant specific kinases that together with the ABA ligands PYR/PYL/RCAR and the type 2C protein phosphatases constitute the central core of ABA perception and signal transduction. In *Arabidopsis* there are a growing number of reports describing SnRK2 function and its regulation, and a conservative mechanism of ABA response between all plant species has been proposed. Here we describe our results on the characterization of *Zea mays* SnRK2.8 and its probable role on ABA signaling. ZmSnRK2.8 is constitutively expressed, rapidly activated by ABA and osmotic stress in vegetative tissues and is capable of complementing the *Arabidopsis* ost1-2 mutant, which is defective in the regulation of transpiration upon water stress. Using a yeast two hybrid system we have identified two new transcription factors that are potential substrates for this kinase (ZmBHLH and ZmSNAC1) and that may be involved in stress response. Transcription factors are interesting study candidates to unravel the molecular mechanisms of SnRK2 kinases since they control cellular adaptation by regulating gene expression and represent important tools for biotechnological crop improvement. Understanding these complex pathways of ABA signaling and pinpointing important proteins of drought response could prove to be fundamental to face global climate change.

P08-15

SnRK2 family in maize: STOP1 protein regulation

Elena Nájjar Duran, Belmiro Vilela, Alicia Moreno, Montserrat Pagès y Victoria Lumbreras

Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG), Cerdanyola del Vallès

Drought is an important environmental factor that limits agricultural production world wide. Therefore, understanding the molecular basis of its tolerance response in plants is necessary for the development of drought-resistant crops. ABA is the major phytohormone that mediates drought responses in land plants. ABA triggers several signaling transduction pathways that lead to an altered gene expression with effects on stress response and acquisition of tolerance. Protein kinases are of dominant importance in ABA signal transduction and among these, SnRK2s are a hub on the regulation of this pathway. When ABA levels increase, SnRK2 becomes active affecting other proteins and cellular processes. However, a full description of the ABA-induced transcriptional regulation also include the identification of new transcriptional regulators SnRK2 dependent. We started cloning a maize SnRK2 gene aligned in the ABA activated group next to *Arabidopsis* OST1 gene which is essential for the ABA dependent closure of stomata under drought stress. To identify new

transcriptional targets affected by SnRK2 activity we took a yeast two-hybrid approach using SnRK2 as bait against a library of drought stressed leaves. This technique yielded different targets and we started to further characterize a Zn-finger-type transcription factor with homology to the *Arabidopsis* STOP1 (*sensitivity to proton rhizotoxicity-1*) protein, a regulator of proton responsive gene expression and ABA signaling components. We are currently characterizing the ZmSTOP1 interaction with SnRK2 and evaluating their function in ABA and in other abiotic/biotic stress responses as a potential candidate for crop yield improvement under sub-optimal environmental conditions.

P08-16

Regulation of two splicing forms of maize transcription factor ZmZIM91 by phosphorylation

Isabel Cristina Vélez-Bermúdez, Montserrat Pagès y Marta Riera

CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica).
 Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Bellaterra -
 Cerdanyola del Vallès

The aim of our work involves characterization of protein kinases and substrates involved in stress response in maize. We performed yeast two-hybrid screening using as a bait the regulatory subunit CK2B1. This screening allows us to identify different putative partners and between them we focus on the characterization of the transcription factor ZmZIM91, that presents two splicing forms. Proteins encoding for the two forms of ZmZIM91 contain four domains (ZIM, JAZ, CCT and GATA) and have not been previously characterized in maize. Using in vivo gel-kinase assay approach we determined that ZmZIM91 proteins are in vivo phosphorylated by at least two different kinases and their phosphorylation is induced under drought stress conditions. In addition, in vitro phosphorylation assays show that ZmZIM91 proteins are not only interacting partners but also CK2 substrates. We also show that ZmZIM91 proteins fused to GFP present nuclear localization and that interaction with protein kinase CK2 is able to relocalize ZmZIM91 proteins in nuclear speckles. Taken together, our results suggest that maize transcription factors ZmZIM91 splicing forms could be regulated by CK2 phosphorylation.

P08-17

Arabidopsis transcription factors involved in stomatal regulation in response to water deficit

Tommaso Legnaioli¹, Jeffrey Leung², Montserrat Pagès¹ y Marta Riera¹

¹CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica).
 Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Bellaterra -
 Cerdanyola del Vallès, ²Institut des Sciences du
 Végétal. ISV - CNRS, Gif-sur-Yvette (France)

The aim of our work is to gain insights on the transcriptional network underlying plants responses to drought stress. We dispose of a battery of several hundreds of lines of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Each of these lines was created to over-express a different transcription factor (TF) through a β -estradiol inducible system. Our goal is to find TFs whose over-expression produces an impaired stomatal response to water deficit; we therefore have performed a fast and sensitive screening method based on the detection of cotyledon temperature by infrared imaging. Seedlings unable of retaining water display lower leaf temperatures compared to the control and vice versa. We have selected several candidate lines that are currently under characterization.

P08r-18

Shedding light on novel interactors of BRL3 brassinosteroid vascular receptor in *Arabidopsis*

Norma Fàbregas Vallvé¹, Na Li², Sacco de Vries² y Ana Caño-Delgado¹

¹Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Barcelona, ²Wageningen University, Wageningen (The Netherlands)

Brassinosteroids (BRs) are steroid hormones that regulate a wealth of plant developmental processes. BR-ligand is perceived by BRI1, a membrane leucine-rich-repeat-receptor-like kinase (LRR-RLK) [1,2,3]. BRI1 is expressed ubiquitously and it activates downstream signalling events that control cell division and growth in a variety of plant organs [4]. BRI1-like receptors family has three BRI1 homologous that were identified based on sequence similarity of the island domain 5 and named BRL1, BRL2 and BRL3. BRL1 and BRL3 receptors were shown to directly bind to BR-ligand with similar binding affinity to the main receptor BRI1 [5]. These two receptors are specifically expressed in the vascular tissue, where BRs are known to contribute in the vascular patterning [6] and control xylem/phloem differentiation ratios. We used a proteomic approach to identify novel signaling components

acting with BRL3 in vascular development. Immunoprecipitation of the BRL3 receptor protein complex was done in stable transgenic plants expressing 35s:BRL3:GFP. To this aim we used anti-GFP antibodies covalently attached to magnetic beads, followed by trypsin digestion and LC-MS/MS. Bioinformatic analysis rendered a list of promising interactors. Validation and initial functional characterization of the most relevant interactors will be presented in the conference.

- [1] Li J. *et al. Cell* 1997; 90 (5): 929.
 [2] Wang Z.Y. *et al. Nature* 2011; 410 (6826): 380.
 [3] Kinoshita *et al. Nature* 2005; 433 (7022): 167.
 [4] Gonzalez-Garcia M.P. *et al. Development* 2011; 138 (5): 849.
 [5] Cano-Delgado, A. *et al. Development* 2004; 131 (21): 5341.
 [6] Ibanes, M. *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 (32): 13630.

P10. Regulación Metabólica

P10-1

Una contribución al estudio de la relación de *MYCN* con el metabolismo de células de neuroblastoma

M^a Victoria Ruiz Pérez¹, Esther Melgarejo², Miguel Ángel Medina² y Francisca Sánchez Jiménez²

¹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, ²Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, y CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga

El neuroblastoma (ORPHA635) es el tumor sólido extracraneal más común en la infancia, suponiendo hasta el 10% de los tumores sólidos en niños menores de 10 años. Este tipo de tumor se origina a partir de células del sistema nervioso simpático, mostrando normalmente su origen en la zona abdominal. La prognosis de la enfermedad ha sido relacionada directamente con el grado de amplificación del gen *MYCN*: A mayor amplificación del gen, peor pronóstico para el desarrollo de la enfermedad.

En el presente trabajo se han utilizado tres líneas de neuroblastoma con diferente grado de amplificación de *MYCN* (Kelly: »100 amplificaciones; IMR-32: »25

amplificaciones, y SK-N-SH: *MYCN* no amplificado), con el objetivo de establecer relaciones entre el perfil metabólico de cada línea celular y la expresión de dicho gen. Se han realizado ensayos de consumo de oxígeno, cuantificación de consumo de glucosa y glutamina, cuantificación de diversos metabolitos y niveles de expresión de varios genes en células control frente a células tratadas con diversos inhibidores metabólicos. Nuestros resultados preliminares muestran claras diferencias en el comportamiento metabólico entre las líneas con y sin amplificación de *MYCN*.

Nota: Financiado por: SAF2008-2522 (MICINN), BIO267, CVI-2999 (PAIDI) y CVI-6585.

P10e-2

Desarrollo y caracterización de un modelo animal para la inhibición de la actividad de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria: el modelo hepático

Laura Formentini, Laura Sánchez-Cenizo, María Sánchez-Aragó, Imke Willers, Inmaculada Martínez-Reyes, Fulvio Santacatterina, Javier García-Bermúdez, Irene Medel Serrano, Cristina Núñez de Arenas, Margarita Chamorro y José M. Cuezva

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

La mitocondria desempeña funciones esenciales para la fisiología de la célula entre las que destacan su función metabólica, bioenergética, de señalización y ejecutora de muerte. Por esta multiplicidad de funciones la alteración de la mitocondria está implicada en la génesis y/o progresión de muchas patologías incluida el cáncer.

Un complejo proteico clave en la generación de energía biológica es la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria. Está bien establecido que cuando la fosforilación oxidativa está alterada la H⁺-ATPasa puede funcionar en sentido reverso actuando como una ATP hidrolasa. Este proceso está regulado por un péptido inhibidor llamado *factor inhibidor 1 de la ATPasa* o IF1. Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado mAbs contra IF1 y descrito que en carcinomas humanos se produce un gran aumento de la expresión de esta proteína (*JBC* 2010; 285: 25308-13). Además, hemos demostrado que IF1 actúa como inhibidor fisiológico de la actividad sintasa de la H⁺-ATP sintasa, lo que promueve un cambio en la energética celular, enfatizando el papel central de IF1 en el control del metabolismo y en patología.

En este trabajo describiremos un modelo de ratón doble transgénico que expresa en hígado una forma mutante de IF1 bajo el control de un promotor regulado por doxiciclina, proporcionando así el primer modelo in vivo de inhibición controlada de la actividad de la H^+ -ATPasa. La sobreexpresión de IF1 promueve un aumento significativo de la razón AMP/ATP hepática, una menor respiración sensible a oligomicina en mitocondrias aisladas y la consiguiente hipoglucemia del animal, todo ello consistente con la inhibición de la gluconeogénesis. Este modelo animal será de gran utilidad para el estudio de la fosforilación oxidativa y su alteración en patología.

P10-3

Construcción de tetrámeros híbridos de la fosfofructokinasa M de mamíferos para su análisis estructural y funcional

Antonio Lázaro, Valentina Sánchez, Claudia Rodríguez, Carmen Hermida, Juan J. Aragón y Oscar H. Martínez-Costa

Departamento de Bioquímica e Instituto Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM, Facultad de Medicina UAM, Madrid

La fosfofructokinasa (PFK) de mamíferos es un enzima tetramérico organizado como un dímero de dímeros. En el isozima M se ha mostrado que los dos sitios catalíticos para fructosa 6-fosfato en un dímero están localizados en la interfase entre las mitades N-terminales, mientras que los dos sitios alostéricos para fructosas bisfosfato pertenecen a las mitades C-terminales. La primera reconstrucción tridimensional de PFK-M obtenida recientemente mediante microscopía electrónica (Arechaga *et al* FASEB J. 24:4960-8, 2010) reveló que los dos dímeros en el tetrámero no muestran una misma conformación, existiendo una separación entre las subunidades de uno de ellos que impide la formación de los sitios para fructosa 6-fosfato, a diferencia de lo que ocurre en el otro dímero. Esto implicaría una marcada diferencia funcional entre ambos dímeros. Pretendemos explorar esta posibilidad mediante la producción de tetrámeros híbridos formados por diferente proporción de subunidades salvajes y subunidades que tengan dañado el sitio para fructosa 6-fosfato. Para ello hemos generado las mutaciones H199E, R201E, R292E y H298E en PFK-M. Los enzimas mutantes fusionados a una etiqueta Flag para favorecer la separación posterior de los tetrámeros híbridos fueron purificados y caracterizados, encontrando que H199E, R292E y H298E disminuyen marcadamente la afinidad por fructosa 6-fosfato, sin modificar significativamente otras propiedades del enzima. Hemos generado tetrámeros híbridos entre H199E y el

enzima salvaje mediante su disociación por dilución y posterior asociación, y estamos actualmente abordando la separación cromatográfica de los híbridos para su caracterización estructural y funcional.

Nota: Financiado por el MICINN (2008-02364 y 2009-13114).

P10-4

Análisis mutacional del sitio ligante para el activador alostérico AMP de la fosfofructokinasa de mamíferos

Oscar H. Martínez-Costa, Valentina Sánchez, Antonio Lázaro, Claudia Rodríguez, David Torres, Carmen Hermida y Juan J. Aragón

Departamento de Bioquímica e Instituto Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM, Facultad de Medicina UAM, Madrid

La fosfofructokinasa (PFK) es un enzima clave para el control de la glicólisis, sin embargo poco se conoce sobre las bases moleculares de su función en eucariotas. La identificación de los residuos aminoácidos pertenecientes a los sitios ligantes y el estudio de su implicación funcional en el enzima de mamíferos se están llevando a cabo por comparación con el enzima bacteriano, de estructura más simple, mediante mutagénesis dirigida en base a que el gen eucariótico se generó por duplicación del procarriótico, y su posterior fusión y divergencia. Se ha propuesto que la duplicación del sitio catalítico para MgATP en la mitad C-terminal originó el sitio alostérico para el activador AMP. Para investigar esta propuesta hemos iniciado la mutación sistemática de los residuos potencialmente implicados Phe440, Arg471, Lys475, Lys476 y Phe499 del isozima M humano mediante sustitución por alanina. Los cDNAs mutantes se expresaron en una cepa de levadura carente de PFK, y los enzimas fueron purificados y caracterizados. Únicamente las mutaciones F440A y K476A reducen la activación por AMP, pero no por cAMP. En el doble mutante F440A-K476A se aumenta la K_{act} para AMP y cAMP en torno a 7 y 3 veces con respecto al enzima salvaje, afectándose también la unión de estos efectores, lo que indica que ambos residuos forman parte del sitio regulador. Adicionalmente hemos identificado que Arg471 pertenece al sitio alostérico para el activador fructosa 2,6-bisfosfato derivado del sitio catalítico duplicado para fructosa 6-fosfato en la mitad C-terminal.

Nota: Financiado por el MICINN (2008-02364 y 2009-13114).

P10r-5

El factor transcripcional HCM1 en *Saccharomyces cerevisiae*: Nuevas funciones y regulación

María José Rodríguez Colman, Joaquim Ros y Elisa Cabiscol

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

Hcm1, en *Saccharomyces cerevisiae*, pertenece a la familia de factores transcripcionales forkheads (Fkh1, Fkh2, Hcm1 and Fhl1). Los primeros estudios en este factor transcripcional lo describen como regulador del ciclo celular, incluyendo la formación del spindle pole y el proceso de gemación.

En mamíferos, los factores de transcripción FoxO (FoxO1, 3, 4 y 6), son una subfamilia de los factores forkhead. Estos factores controlan varias funciones biológicas tales como, resistencia a estrés, reparación del DNA, metabolismo, ciclo celular y apoptosis. Dado a las múltiples funciones que desempeñan, estos factores se encuentran estrictamente regulados a través de modificaciones postraduccionales, como fosforilación, acetilación y ubiquitinación.

Trabajo previo realizado en nuestro laboratorio describe nuevas funciones de Hcm1 adicionales a la regulación del ciclo celular. Hemos encontrado que Hcm1 está relacionado con la respuesta a estrés oxidativo y biogénesis mitocondrial. Además hemos descrito que la respuesta a estrés oxidativo de este factor es regulable por Sir2, una histona deacetilasa NAD dependiente relacionada con longevidad. Nuestros resultados más recientes indican una posible relación entre Hcm1 y metabolismo celular, ya que este factor es capaz de responder a la variación en los niveles nutricionales del medio de cultivo. La descripción de nuevas funciones de Hcm1 sugiere que este factor también debe ser estrictamente regulado. Actualmente estamos interesados en la regulación de Hcm1 por quinasas, proponiendo como posibles reguladores a Tor1, Sch9 y Snf1, que se encuentran relacionadas tanto con la regulación metabólica como con el estrés oxidativo entre otros.

P10m-6

CPT1C participa en el control de la homeostasis energética regulando los niveles de ceramidas hipotalámicas

Núria Casals Farré¹, Sara Ramírez Flores¹, Jordi Jacas Mateu¹, Helena Muley Vilamú¹, Patricia Carrasco Rodríguez¹, Dolores Serra Cucurull² y Fausto García Hegardt²

¹Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

Los enzimas CPT1 facilitan la entrada de los aciles-CoA a la matriz mitocondrial para la β -oxidación. Sin embargo, en cerebro existe una isoforma específica de este tejido, la CPT1C, que se localiza en el retículo endoplasmático y se desconoce su función molecular. El objetivo de nuestro grupo es determinar la función metabólica de CPT1C en el cerebro. Para ello, hemos desarrollado ratones *knock-out* (KO) de CPT1C. El estudio metabólico de los mismos demuestra que tienen una ingesta alimentaria reducida y, en situaciones de ayuno, un metabolismo oxidativo periférico reducido, lo que indica que el hipotálamo no es capaz de responder al ayuno ni de enviar el mensaje adecuado a los tejidos periféricos. También hemos demostrado que los ratones KO no responden a la señal de saciedad de la leptina ni de la droga anorexigénica cerulelina. Como CPT1C se localiza en el RE, órgano donde tiene lugar la síntesis esfingolípidos a partir de los aciles-CoA, decidimos estudiar si los niveles de ceramidas estaban alterados en los ratones KO. Los resultados muestran que los niveles de ceramidas hipotalámicas aumentan en respuesta al ayuno en ratones salvaje mientras que no lo hacen en los ratones KO. Para comprobar que CPT1C facilita la síntesis de ceramidas, sobreexpresamos CPT1C en cultivos primarios de neuronas y analizamos los niveles de ceramidas en presencia o ausencia de myriocin, un inhibidor de la síntesis de novo de ceramida. Los resultados muestran que CPT1C facilita la síntesis *de novo* de ceramidas. Es la primera vez que se describe que los niveles de las ceramidas hipotalámicas, regulados por el enzima CPT1C, controlan la ingesta alimentaria y la homeostasis energética.

P10-7

NR5A2, un regulador del metabolismo de la glucosa

Alfonso Bolado Carrancio¹, Javier Pérez¹, Jesus Sainz², Maria Angeles Quiles¹, Jose Antonio Riancho del Moral³ y Jose Carlos Rodríguez Rey¹

¹Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Cantabria, Santander, ²Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Santander, ³Departamento de Medicina y Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad Cantabria, Santander

NR5A2, también conocido como LRH-1 (Liver Receptor Homolog 1), es un receptor nuclear huérfano expresado mayoritariamente en tejidos derivados del endodermo. Inicialmente fue descrito como un regulador de la síntesis y

transporte de colesterol y derivados, sales biliares y estrógenos. Sin embargo, en los últimos años el papel de NR5A2 ha aumentado ostensiblemente y se ha descrito su papel en la regulación de diversos genes asociados a la proliferación, el control de la pluripotencia y la síntesis de ácidos grasos.

Previamente, nuestro grupo encontró asociación entre diversos SNPs de NR5A2 con IMC (Índice de Masa Corporal) y diabetes. Para explorar esta asociación realizamos experimentos de silenciamientos con siRNAs específicos contra NR5A2, empleando diversas muestras de RNA tratados para realizar un RNA sequencing. Los resultados muestran que una importante fracción de genes asociados al metabolismo de la glucosa tenían su expresión regulada por NR5A2.

Para realizar un estudio más exhaustivo de los efectos metabólicos de NR5A2 construimos diversas líneas que inhibían o sobreexpresaban NR5A2. Los resultados de los estudios de expresión de diversos genes implicados en la glucólisis, la gluconeogénesis y el metabolismo de ácidos grasos, así como los estudios de captación y consumo de glucosa muestran que NR5A2 es un regulador del metabolismo de la glucosa y lo señalan como un posible agente diabético y obesogénico.

P10-8

Efectos tóxicos del Cd²⁺ y Hg²⁺ en la primera fase de la glucólisis

María José Ramírez-Bajo¹, Pedro de Aauri², Fernando Ortega³, Hans Westerhoff⁴, Josep Lluís Gelpí², Josep J. Centelles² y Marta Cascante²

¹LENIT (Laboratori Experimental de Nefrologia i Transplantament), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, ³AstraZeneca, R&D DECS Computational Sciences, Cheshire (UK),

⁴Department of Molecular Cell Physiology, BioCentrum Amsterdam, Faculty of Biology, Amsterdam (The Netherlands)

La presencia de metales pesados en el entorno ha aumentado en la última década debido a la intervención humana (actividades industriales, tráfico, algunos procesos de agricultura y disminución de los combustibles fósiles). Dichos metales no pueden degradarse, con lo que se acumulan en la cadena alimentaria, provocando riesgos para la salud humana y para el entorno. Sin embargo, la toxicidad de cada metal depende de diversos factores, entre los que destacan la duración, cantidad y forma de exposición; así como su forma química.

El objetivo de este estudio consiste en analizar e identificar los lugares de acción y el efecto de dos metales pesados en

su forma divalente, Hg²⁺ y Cd²⁺, sobre la primera fase de la glucólisis. Para ello se analizan en extractos de músculo de ratón las actividades de los enzimas individuales de esta primera fase, así como el flujo global y las concentraciones de los intermediarios, tanto en presencia como en ausencia de los metales pesados. Se identifican las concentraciones de metales que provocan un 50% de disminución de producción de triosas y de los enzimas individuales inhibidos por estos metales. En trabajos anteriores hemos estudiado mediante análisis del control metabólico (MCA) los coeficientes de control de los enzimas en estado estacionario, así como el efecto inhibitorio de otro metal pesado, Cu²⁺ sobre la primera fase de la glucólisis. Aquí queremos comparar también el efecto del Cu²⁺ con los efectos de Hg²⁺ y Cd²⁺. Para ello, se construye un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE), que explica las curvas de decaimiento de los enzimas inhibidos y del flujo, así como los niveles de los intermediarios.

P10-9

Salida de colesterol de membrana plasmática inducida por alquilfosfolípidos en células HepG2

Pablo Ríos-Marco¹, José M. Jiménez-López¹, Mario Martín-Fernández¹, Miguel García-González², Josefa L. Segovia¹, Carmen Marco¹ y María P. Carrasco¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, Granada, ²Escuela Universitaria de Magisterio La Inmaculada Concepción. Universidad de Granada, Granada

Las alquilfosfolípidos (APLs) son un grupo de agentes antiproliferativos sintéticos y metabólicamente estables, candidatos prometedores de una nueva aproximación a la quimioterapia contra el cáncer. El responsable último de su capacidad antiproliferativa debe ser aún elucidado, aunque algunos estudios bioquímicos han revelado que, debido a sus propiedades anfifílicas, interaccionan con la membrana celular y rápidamente alcanzan otras membranas subcelulares, siendo capaces de afectar a diferentes rutas metabólicas y de señalización celular, entre ellas, las de colesterol y fosfolípidos. En este trabajo, describimos una nueva propiedad de los APLs, ya que comprobamos su capacidad para actuar como agentes muy eficaces en la extracción de colesterol de la membrana plasmática en células HepG2. La salida de colesterol desde la membrana plasmática, de hecho, se acompaña de una reducción en los niveles intracelulares de este esteroide. Nuestros resultados demuestran que los APLs pueden actuar de modo semejante

a aceptores de colesterol, tales como ciclodextrinas, muy utilizadas en estudios bioquímicos. Esta nueva propiedad, aquí descrita, puede ser explicada por la alta afinidad que estos agentes presentan por los esteroides, y debe ser tenida en cuenta en determinadas situaciones experimentales así como en la administración clínica de estos fármacos antitumorales.

Nota: Financiado por la Junta de Andalucía (CTS236).

P10r-10

Perfiles genéticos y metabólicos en la involución de la glándula mamaria tras la lactancia

Ivan Ferrer-Vicens, Eva Serna, Daniel Monleón, Concha García, Elena R. García-Trevijano, Luís Torres, Vicente J. Miralles, Rosa Zaragoza y Juan R. Viña

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Fundación Investigación Hospital Clínico Valencia-INCLIVA. Universidad de Valencia, Valencia

Los cambios histológicos y funcionales que se producen en la glándula mamaria tras la lactancia, están regulados por cambios en la expresión génica. En este estudio, realizamos microarray de expresión en la glándula mamaria de ratones en el pico de lactancia y tras 2 días de destete. Se ven diferencias en genes asociados con el metabolismo, apoptosis/proliferación, respuesta inmune e inflamación y remodelación tisular. Durante la involución se inhiben genes que regulan el metabolismo de lípidos (cd36, fasn, fat, fabp3, facl2; elov15) y de carbohidratos (Hk1, pdh, pc, pfk, acc, mod1) así como los transportadores de glucosa (slc2a1, glut1), la síntesis de b-caseína y de lactosa. A diferencia de estos genes del metabolismo, los genes implicados en la respuesta inmune y la señalización de citoquinas pro-inflamatorias (C3, LIF, Csf2, Csf3, Tnf) están aumentados tras el destete. Todas estas adaptaciones favorecen la remodelación tisular, como así lo indica la inducción de los genes que codifican proteasas de matriz extracelular, calpains y catepsinas lisosomales. Para correlacionar estos cambios en la expresión génica con otros parámetros fisiológicos, se realizó un estudio metabólico por HRM de estas mismas muestras. Al comparar ambos perfiles metabólicos se observó un incremento significativo durante la involución tanto en los niveles de aminoácidos como en los niveles de colina y glicerol, perfiles propios de rotura de membranas celulares y degradación de proteínas. Estos resultados muestran cómo tras la lactancia se produce una drástica disminución del metabolismo, junto con una degradación proteica y pérdida de células epiteliales, induciéndose la remodelación tisular.

Nota: Agrad. BFU2010/18253; GVPROMETEO 2010-075; PS09-02360.

P10m-11

Mfn2 links mitochondrial and ER function with insulin signaling, and is essential for normal glucose homeostasis

David Sebastián, Jessica Segalés, María Isabel Hernández-Álvarez, Eleonora Soriano, Juan Pablo Muñoz, David Sala, Marc Liesa, Jose C. Paz, Sara Pich, Manuel Palacin y Antonio Zorzano
Institute for Research in Biomedicine Barcelona, University of Barcelona, Barcelona

Mitochondria are dynamic organelles that play a key role in energy conversion. Optimal mitochondrial function is ensured by a quality control system tightly coupled to fusion and fission. In this connection, Mfn2 participates in mitochondrial fusion, and undergoes repression in muscle from obese or type 2 diabetic patients. Here we provide in vivo evidence that Mfn2 plays an essential role in metabolic homeostasis. Liver-specific ablation of Mfn2 in mice led to numerous metabolic abnormalities, characterized by glucose intolerance, enhanced hepatic gluconeogenesis, and insulin resistance. Mfn2 deficiency impaired insulin signaling in liver and muscle. Furthermore, Mfn2 deficiency was associated to enhanced ROS production, JNK phosphorylation, and ER stress. Antioxidants, inhibition of JNK or the use of chemical chaperones ameliorated insulin signaling. This study provides the first description of an unexpected role of Mfn2 on insulin signaling, and demonstrates the importance of mitochondrial dynamics on cell metabolism and hormone action.

P10m-12

Caracterización metabólica del ratón *knockout* para los receptores de las neuregulinas ErbB2 y ErbB4 en músculo esquelético

Vicente Martínez-Redondo¹, Hans Rudolf Brenner², Antonio Zorzano³ y Anna Gumà¹

¹*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona & Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, L'Hospitalet Llobregat,*

²*University of Basel, Department of Biomedicine, Institute of Physiology, Basel (Switzerland),*

³*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona & Institut Recerca Biomèdica de Barcelona, Parc Científic de Barcelona, Barcelona*

La neuregulina, factor de crecimiento de la familia EGF implicado en desarrollo cardiaco, neuronal y glial y en la

formación de la placa motora, se ha vinculado recientemente a la regulación del metabolismo energético muscular diferenciándose según el tratamiento, efectos agudos (estimula la captación de glucosa por translocación de GLUT4 a membrana plasmática en un proceso independiente de insulina y relacionado con la contracción muscular) y efectos crónicos (mejora la capacidad oxidativa de cultivos miocíticos aumentando la biogénesis mitocondrial y la expresión de GLUT4 y de elementos de la cadena respiratoria), convirtiéndose en objeto de estudio para el diseño de terapias en diabetes de tipo 2. Se estudió el impacto sobre el metabolismo glucídico y energético de la supresión de los receptores de las neuregulinas ErbB2 y ErbB4 en el músculo esquelético de ratones. El doble KO de ErbB2/4 presenta menor peso y menor adiposidad con glucemia y trigliceridemia reducidas en ayuno y alimentación, así como una mejora en la tolerancia a la glucosa y la insulina. La capacidad del ejercicio para estimular la captación de glucosa tampoco está afectada. El desarrollo muscular es normal siendo el peso relativo de los músculos de los doble KO igual o mayor que el de los controles, sin cambios en ATP, lactato, glucógeno o triglicéridos musculares, ni cambios en la expresión de GLUT4, marcadores mitocondriales o complejos de la cadena oxidativa. Sin embargo, estudios de calorimetría indirecta indican que el doble KO obtiene proporcionalmente mayor cantidad de energía de la oxidación de glucosa que de ácidos grasos, tanto en situación de reposo como de ejercicio.

P10-13

Dimorfismo sexual en la respuesta proinflamatoria desarrollada en el tejido adiposo gonadal en la obesidad

Emilia Amengual-Cladera, Isabel Lladó, Ana M. Proenza y Magdalena Gianotti

Grup Metabolisme Energètic i Nutrició, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears. CIBERobn (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Palma de Mallorca

El tejido adiposo blanco (TAB) secreta un amplio número de adipocinas involucradas en la regulación de diversos procesos metabólicos, entre los que destaca la inflamación. Las dietas hipercalóricas se han relacionado con el desarrollo de un estado proinflamatorio derivado de la alteración de la expresión y secreción de ciertas adipocinas, capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno y alterar la respuesta a la insulina. Se han descrito diferencias entre sexos en la incidencia de

patologías asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares. El objetivo fue investigar si existe un dimorfismo sexual en el estado proinflamatorio del TAB en la obesidad y estudiar in vitro el papel del estrés oxidativo en la respuesta adipocitaria.

Se usaron los depósitos de TAB gonadal de ratas macho y hembra alimentadas con dieta estándar o hiperlipídica. Se determinaron los niveles séricos de glucosa y de adiponectina, leptina y resistina. Los niveles de ARNm de estas adipocinas así como de marcadores de hipoxia e inflamación se cuantificaron por PCR a tiempo real. Además, se aislaron adipocitos maduros que fueron tratados con H₂O₂ 100µM durante 18 horas.

La mayor expandabilidad del tejido adiposo periovárico en comparación con el epididimal lleva al desarrollo de un menor estado de hipoxia e inflamación en las hembras que coincide con un mejor perfil sistémico de sensibilidad a la insulina. Sin embargo, los experimentos in vitro revelan un efecto más perjudicial del H₂O₂ en los adipocitos aislados de las hembras. Esta discrepancia sugiere que las diferencias entre sexos en la respuesta del TAB gonadal al estado obeso serían atribuibles al mayor grado de infiltración de células no adipocitarias que presentan los machos.

P10m-14

Carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1A overexpression in liver prevents obesity and reduces insulin resistance in obese mice

Josep Maria Orellana-Gavaldà¹, Laura Herrero¹, Maria Ida Malandrino¹, Astrid Pañeda², Maria Sol Rodríguez-Peña³, Harald Petry³, Guillermina Asins¹, Sander Van Deventer³, Fausto G. Hegardt¹ y Dolors Serra¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, IBUB, CIBERobn, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Division of Gene Therapy and Hepatology, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, ³Amsterdam Molecular Therapeutics, Amsterdam (Netherlands)

Carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1 is the rate-limiting step in mitochondrial fatty-acid β-oxidation and it is tightly regulated by its physiological inhibitor malonyl-CoA. In this work, we used a mutant but active form of CPT1A (CPT1AM), which is insensitive to malonyl-CoA and therefore leads to a permanent increase in the rate of fatty acid oxidation (FAO), independently of the glucose-derived malonyl-CoA levels. Here, we also used the human-safe non-immunoreactive adeno-associated viruses (AAV) to mediate long-term hepatic gene transfer of CPT1A or its

active mutant form CPT1AM, to high-fat diet-treated and genetically obese (db/db) mice. Our results show for the first time that a chronic increase in liver FAO is able to reduce hepatic steatosis, weight gain, diabetes and obesity-induced insulin resistance in CPT1A- and, to a greater extent, in CPT1AM-expressing mice. The increase in hepatic FAO correlated with a reduction in both liver inflammatory profile and ROS levels and an enhanced CO₂ and ketone bodies production. AAV-treatment was also able to affect systemically by reducing epididymal adipose tissue weight and inflammation and to improve insulin signaling in liver, adipose tissue and muscle. In conclusion, a chronic increase in liver FAO improves the obese metabolic phenotype, which indicates that AAV-mediated CPT1A expression could be a potential molecular therapy for obesity and diabetes.

P10r-15

Overexpression of HMGA1 in adipose tissue prevents obesity and insulin resistance

Altamira Arce, Sylvie Franckhauser, Miquel Garcia, Tura Ferre, Ivet Elias, Carles Roca, Pedro Otaegui, Anna Pujol, Fátima Bosch y Efrén Riu
Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, y CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Bellaterra

Adipocyte functionality is lost during obesity and has been related to impaired transcriptional regulation of the key factors that control adipogenesis. Among them, the high mobility group A1 (HMGA1) proteins may play an important role in adipogenesis. To examine the effects of adipose tissue HMGA1 expression in the development of obesity and insulin resistance, we generated transgenic mice overexpressing HMGA1 specifically in adipose tissue (ap2-HMGA1). HMGA1 expression in fat tissues was markedly increased compared with control animals. Intriguingly, these transgenic mice showed decreased epididymal WAT and BAT weight and lower triglyceride content than control mice. These transgenic mice were normoglycemic and normoinsulinemic and no differences in glucose tolerance and insulin sensitivity were observed between groups. In contrast, when fed a high-fat diet (HFD), body weight gain was lower in transgenic than in control mice. This was parallel to lower WAT and BAT weight. Transgenic mice under a HFD showed increased glucose tolerance and whole body insulin sensitivity. These transgenic mice also showed decreased levels of serum free fatty acid, triglyceride and glycerol compared to controls.

The overexpression of HMGA1 in adipose tissue of transgenic mice led to a marked decrease in the expression of genes involved in fatty acid metabolism and in mitochondrial biogenesis and function, suggesting mitochondrial dysfunction of the adipose tissue in these transgenic mice. Currently, we are further analyzing the mechanisms by which HMGA1-mediated adipose tissue dysfunction in transgenic mice protects them against high-fat diet-induced insulin resistance and obesity.

P10-16

Características cinéticas y posible implicación en represión catabólica de los enzimas fosforilantes de glucosa en *Yarrowia lipolytica*

Carmen-Lisset Flores y Carlos Gancedo
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid

Yarrowia lipolytica se encuentra filogenéticamente muy alejada de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* y presenta importantes diferencias con ella en las propiedades cinéticas de ciertos enzimas glicolíticos y en la regulación de la transcripción de algunos genes gluconeogénicos. Dada la importancia de las actividades fosforilantes de azúcares en el establecimiento de la represión catabólica y en otros procesos celulares hemos iniciado un estudio de dichos enzimas en esta levadura. *Y. lipolytica* posee una hexokinasa y una glucocinasa. Datos de RT-qPCR muestran que los correspondientes genes codificantes (*HXK1* y *GLK1*) se expresan simultáneamente durante el crecimiento en glucosa y medidas de actividad enzimática indican que la actividad glucocinasa es 3 veces mayor que la de hexokinasa. La actividad fosforilante total de *Y. lipolytica* crecida en glucosa no supera el 20% de la encontrada en *S. cerevisiae* en las mismas condiciones. Hemos clonado el gen *GLK1* de *Y. lipolytica* y mostrado su funcionalidad en *S. cerevisiae*. Su interrupción enlentece el crecimiento de *Y. lipolytica* en glucosa. Un doble mutante con interrupciones en los genes *GLK1* y *HXK1*, no crece en glucosa ni en fructosa, indicando que no hay otra actividad que contribuya significativamente al crecimiento en esos azúcares. Estamos investigando si la sobreexpresión de *GLK1* y *HXK1* aumenta el consumo de azúcares y si modifica la velocidad de crecimiento de la levadura. Asimismo estamos interesados en estudiar la posible influencia de las interrupciones en dichos genes en la regulación de la transcripción de genes que codifican enzimas reprimidos por glucosa.

Nota: Agradecimientos: Financiado por proyectos BFU2010-19628-CO2-02 (MICINN) e Intramural Especial CSIC 200420E56.

P10-17

Progesterins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) in breast cancer cells

Laura Novellademunt Vilaseca¹, Mercè Obach¹, Lluís Millán Ariño², Francesc Ventura¹, Anna Manzano¹, Jose Luis Rosa¹, Albert Jordan², Àurea Navarro Sabaté¹ y Ramon Bartrons¹

¹Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona – IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, ²Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Barcelona

6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) catalyzes the synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), a key modulator of glycolysis and gluconeogenesis. PFKFB3 gene is extensively involved in cell proliferation due to its key role in carbohydrate metabolism. Here we analyse its mechanism of regulation by progesterins in breast cancer cells. We report that exposure of T47D cells to synthetic progesterins (ORG2058 or Norgestrel) leads to a rapid increase in Fru-2,6-P₂ concentration. Western blot results are compatible with a short-term activation due to PFKFB3 isoenzyme phosphorylation and a long-term sustained action due to increased PFKFB3 protein levels. Transient transfection of T47D cells with deleted gene promoter constructs allowed us to identify a progesterone regulatory element (PRE) to which progesterone receptor binds and thus transactivates PFKFB3 gene transcription. Progesterone Receptor (PR) expression, in the PR-negative cell line (MDA-MB-231), induces endogen PFKFB3 expression in response to Norgestrel. Direct Binding of PR to the PRE box (-3490 nt) was confirmed by ChIP experiments. A dual mechanism affecting PFKFB3 protein and gene regulation operates in order to assure glycolysis in breast cancer cells. An immediate early response through MAPK phosphorylation of PFKFB3 protein is followed by activation of mRNA transcription via cis-acting sequences on PFKFB3 promoter.

P10-18

Cooperatividad cinética de tirosinasa. Un mecanismo general

Jose Luis Muñoz-Muñoz¹, Francisco García-Molina¹, María García-Molina¹, Ramón Varón², Jose Tudela¹, Jose N. Rodríguez-López¹ y Francisco García-Canovas¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - A, Universidad de Murcia, Murcia, ²Departamento de

Química-Física. Escuela de Ingenieros Industriales de Albacete. Universidad de Castilla la Mancha, Albacete

El estudio cinético de tirosinasa de champiñón muestra cooperatividad con un sustrato (oxígeno) e inhibición por exceso de otro sustrato (*o*-difenol). Estas dos características ponen de manifiesto la existencia de cooperatividad cinética que pueden presentar enzimas monoméricas cuando la formación del complejo ternario (enzima/*o*-difenol/oxígeno), en estado estacionario, puede conseguirse a través de dos rutas, una rápida (ruta cinéticamente favorecida) y otra más lenta (ruta lenta). Este comportamiento cinético desaparece cuando el enzima actúa sobre monofenoles, indicando que en este caso existe equilibrio rápido. El análisis cinético permite caracterizar cinéticamente los sustratos utilizados.

Nota: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, España) Proyectos SAF2009-12043-C02-01 y BIO2009-12956, de la Fundación Séneca (CARM, Murcia, España) 08856/PI/08 y 08595/PI/08 y de la Consejería de Educación (CARM, Murcia, España) BIO-BMC 06/01-0004. JLMM y FGM tienen dos becas predoctorales de la Fundación Caja Murcia (Murcia, España).

P10-19

Inactivación indirecta de tirosinasa en su acción sobre tirosina

Francisco García Molina¹, Jose Luis Muñoz Muñoz¹, María García Molina¹, Ramón Varón², Pedro Antonio García-Ruiz³, José Neptuno Rodríguez-López¹, Jose Tudela¹ y Francisco García-Canovas¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - A, Universidad de Murcia, Murcia, ²Departamento de Química-Física. Escuela de Ingenieros Industriales de Albacete. Universidad de Castilla la Mancha, Albacete, ³Grupo de Química de Carbohidratos y Biotecnología de Alimentos, Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química, Murcia

Bajo condiciones anaerobias, el sustrato fisiológico de tirosinasa L-tirosina y su isómero D-tirosina no inactivan a las formas enzimáticas *meta*- y *desoxi*-tirosinasa; por el contrario, ambos isómeros protegen al enzima de la inactivación por L-dopa. Nosotros sugerimos que, bajo condiciones aerobias, L- y D-tirosina no inactivan directamente al enzima (inactivación suicida), sino que es el *o*-difenol acumulado en el medio de reacción a partir de la *o*-dopaquinona el responsable de esta inactivación. Para explicar estos procesos de inhibición, proponemos diferentes mecanismos cinéticos.

Nota: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, España) Proyectos SAF2009-12043-C02-01 y BIO2009-12956, de la Fundación Séneca (CARM, Murcia, España) 08856/PI/08 y 08595/PI/08 y de la Consejería de Educación (CARM, Murcia, España) BIO-BMC 06/01-0004. JLMM y FGM tienen dos becas predoctorales de la Fundación Caja Murcia (Murcia, España).

P10-20

TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) knockdown results in radiosensitization of glioma cells

Miguel Ángel Peña Rico¹, María Nieves Calvo Vidal¹, Ruth Villalonga², Fina Martínez², Pepita Giménez Bonafé², Áurea Navarro Sabaté¹, Avelina Tortosa², Ramon Bartrons¹ y Anna Manzano¹

¹Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona - IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, ²Unitat de Fisiologia, Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat

The TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) functions to lower fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) levels in cells, consequently decreasing glycolysis and leading to the scavenging of reactive oxygen species (ROS), which correlate with a higher resistance to cell death. The decrease in intracellular ROS levels in response to TIGAR may also play a role in the ability of p53 to protect from the accumulation of genomic lesions. Given these good prospects of TIGAR for metabolic regulation and p53-response modulation, we analyzed the effects of TIGAR knockdown in U87MG and T98G glioblastoma-derived cell lines. After TIGAR-knockdown in glioblastoma cell lines, different metabolic parameters were assayed, showing an increase in Fru-2,6-P₂, lactate and ROS levels, with a concomitant decrease in reduced glutathione (GSH) levels. In addition, cell growth was inhibited without evidence of apoptotic or autophagic cell death. In contrast, a clear senescent phenotype was observed. We also found that TIGAR protein levels were increased shortly after irradiation. In addition, avoiding radiotherapy-triggered TIGAR induction by gene silencing resulted in the loss of capacity of glioblastoma cells to form colonies in culture and the delay of DNA repair mechanisms, based in γ -H2AX foci, leading cells to undergo morphological changes compatible with a senescent phenotype. Thus, the results obtained raised the

possibility to consider TIGAR as a therapeutic target to increase radiotherapy effects. TIGAR abrogation provides a novel adjunctive therapeutic strategy against glial tumors by increasing radiation-induced cell impairment, thus allowing the use of lower radiotherapeutic doses.

P10m-21

Overexpression of Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A) protects adipocytes from fatty-acid induced insulin resistance

María Ida Malandrino, María del Mar Arasa Gaspar, Dolores Serra, Guillermina Asins, Valentina Magli, Fausto Garcia Hegardt y Laura Herrero

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, IBUB, CIBERobn, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

The pathophysiology of obesity-induced insulin resistance and type 2 diabetes is thought to be due to both ectopic fat deposition and adipose tissue inflammation. During obesity, adipocytes increase in number and size reaching a limit in their storage capacity that leads to adipocyte death and immune cell infiltration. In this study we propose that an increase in the fatty acid oxidation rate in adipocytes could protect them from obesity and insulin resistance, by a decrease on the lipid content and inflammatory levels. The enzyme carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) catalyzes the rate-limiting step in the transport of fatty acids into the mitochondria for their oxidation. Malonyl-CoA derived from glucose metabolism regulates fatty acid oxidation by inhibiting CPT1A. Here, we overexpressed CPT1A and CPT1AM (a permanently active mutant form of CPT1A, insensitive to its inhibitor malonyl-CoA) in 3T3-L1 CAR1 adipocytes by adenovirus infection. In our conditions, CPT1A protein and mRNA levels increased by 6-, and 3-fold, respectively, both for CPT1A and CPT1AM expression compared to control. Interestingly, CPT1A overexpression restored the impairment of fatty-acid induced insulin signaling (measured by pAKT). In conclusion our study shows a beneficial effect of CPT1A overexpression on fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. This points out to CPT1A and an increase in adipocyte fatty-acid oxidation as a promising strategy for the treatment of the obesity-induced metabolic syndrome.

P10m-22

La sobre-expresión de la carnitina palmitoiltransferasa (CPT) 1A en hipotálamo produce resistencia a la insulina y altera la expresión génica en hipotálamo e hígado

Paula Mera¹, Laura Herrero¹, Macarena Pozo¹, Joan Francesc Mir¹, Guillermina Asins¹, Fausto G. Hegardt¹, Sander Van Deverter², Harald Petry² y Dolors Serra¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, IBUB, CIBERobn, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Amsterdam Molecular Therapeutics, Amsterdam (Netherlands)

El hipotálamo está considerado como el principal sensor de la situación energética del organismo, siendo capaz de integrar información referente al estado nutricional y de responder en consecuencia regulando diferentes procesos, entre ellos la producción de glucosa hepática. Los mecanismos moleculares implicados en este control son en parte desconocidos, sin embargo, estudios recientes sugieren que, en el hipotálamo, los ácidos grasos de cadena larga son cruciales en la regulación de la homeostasis de la glucosa. CPT1A facilita la entrada de los ácidos grasos en la mitocondria y es el principal regulador de la β -oxidación mitocondrial. Para profundizar en el papel de este enzima en el control del metabolismo glucídico, sobre-expresamos una isoforma permanentemente activa de esta proteína (CPT1AM) en ratas macho adultas. Para ello inyectamos en el hipotálamo ventromedial (VMH), virus adeno-asociados que contienen el cDNA de CPT1AM. La sobre-expresión a largo plazo de CPT1AM en el VMH causa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Asimismo, produce cambios en la expresión génica tanto en el hipotálamo como en el hígado. En el hipotálamo se observa un aumento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la ingesta y en el hígado un aumento en la expresión del enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), sugiriendo cambios en la gluconeogénesis hepática. Estos resultados apuntan a que la CPT1A del hipotálamo tiene un papel clave en la regulación central de la homeostasis de la glucosa.

P10-23

Efecto del resveratrol sobre el estrés de retículo y sobre la lipotoxicidad inducida por palmitato en células HepG2

Cristina Rojas, Cristina Valls, Gerard Pujadas, Santiago Garcia-Vallvé y Miquel Mulero

Grupo de Nutrigenómica. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona

Existe una intersección molecular entre el estrés del retículo endoplasmático (ER stress) y la lipogénesis hepática. Se ha demostrado que el resveratrol (RSV) reduce la acumulación lipídica en células HepG2 tratadas con una alta concentración de ácidos grasos. El presente trabajo pretendía determinar si los efectos atenuantes del RSV en la acumulación lipídica podrían ser debidos en parte a la hipotética mejora del mecanismo de ER stress en un modelo de esteatosis hepática en HepG2. En tratamientos con concentraciones crecientes de RSV a diferentes tiempos se observó un aumento del splicing Xbp1 y de la expresión de CHOP, mientras que disminuyó la viabilidad. Co-tratamientos de RSV a concentraciones crecientes de palmitato disminuyeron la viabilidad de manera dosis y tiempo dependiente. En el co-tratamiento de RSV a concentraciones crecientes de palmitato durante 8 h obtuvimos que el RSV incrementa el splicing Xbp1 y marcadores de ER stress en sinergia con el palmitato. Por otro lado, en HepG2 co-tratadas con 250 μ M palmitato y con concentraciones crecientes de RSV durante 24 h se obtuvo que el palmitato induce ER stress en sinergia con el RSV debido al aumento del splicing Xbp1 y a la expresión de CHOP de forma dosis dependiente. Sorprendentemente, se observó un aumento de la acumulación de triglicéridos. Los resultados obtenidos demuestran que el RSV incrementa tanto el ER stress como la lipogénesis en HepG2 tratadas con palmitato. El aumento del splicing de Xbp1, un factor adipogénico, inducido por RSV podría estar ligado al aumento de la lipogénesis hepática. No obstante, los resultados también sugieren que el RSV induce apoptosis en sinergia con palmitato en un modelo de célula cancerosa.

P10-24

FSP27/CIDEc expression is induced in the initial phase of fasting and regulated by HMGCS2

Anna Vilà-Brau, Ana Luísa De Sousa-Coelho, Diego Haro Bautista y Pedro F. Marrero González
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona & Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona, Barcelona

We have recently shown that HMGCS2, the gene that regulates ketone body production, is also able to regulate fatty acid oxidation (FAO). We now show that the in vivo expression of a specific shRNA was able to diminish the liver HMGCS2 activity by 50%, which correlates with a decreasing of circulant ketone bodies of 20% in serum of fasted animals, and produces changes in gene expression.

Interestingly, the most up regulated gene by the jamming of ketogenesis is FSP27/CIDEA, which encodes for a protein associated with lipid droplets.

To understand the role of FSP27 during the fasting adaptation process, we analyzed gene expression at different times after food removal. During initial phase of fasting, the FSP27 expression increases 700-fold in *wild type* animals. This expression became weaker during the late phase of fasting, when HMGCS2, and other FAO genes, achieved the maximum expression levels. Therefore, we are showing that a lipid-droplet-associated protein could play a role during initial phases of fasting process into the liver, and that this expression decreases when the liver is firmly adapted to oxidise fatty acids.

P10-25

Fgf21 is a MyoD target gene down regulated by FoxO1

Joana Relat Pardo, M^a del Mar Gacias Monserrat, Albert Pérez Martí, Pedro F. Marrero González y Diego Haro Bautista

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona & Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona

Fgf21 is a potent metabolic regulator that plays an important role in eliciting and coordinating the adaptive response to prolonged starvation. FGF21 is expressed mainly in fasted liver but also in special conditions in muscle. FGF21 expression has been detected in muscle of Akt-overexpressing mice, in human hyperinsulinemia and in the mitochondrial myopathy Deletor. In this work, we show that Fgf21 is a MyoD target gene down regulated by FoxO1 in C2C12 cells paralleling the repression of MyoD. These data indicate that FGF21 expression is under tissue specific regulation. According with FGF21 muscle expression in pathological situations its mRNA is overexpressed in the heart of ob/ob mice, which give us an animal model to study the impact of this protein in muscle homeostasis and a new tool to modulate lipid and glucose metabolism in these animals.

P10m-26

FoxO1 represses PPARα activation of FGF21 in human hepatic cells

Ana Luísa De Sousa-Coelho, Diego Haro y Pedro F. Marrero González

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona & Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona, Barcelona

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a novel metabolic regulator produced primarily by the liver that exerts potent antidiabetic and lipid-lowering effects in animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus. Hepatic gene expression of FGF21 is regulated by PPARα and is highly induced by fasting. Recently, it was shown that FoxO1 ablation increased FGF21 expression in hyperglycemia. To better understand the molecular mechanisms that regulate the expression of FGF21 in liver we have used a human hepatoma cell line and we have seen that in a basal condition when FoxO1 is overexpressed it does not exert any effect in FGF21 expression. However, in the presence of PPARα activation of this gene, FoxO1 has an inhibitory action. We have seen that FoxO1 physically interacts with PPARα and seems to be able to retain this transcription factor in the nucleus avoiding its turnover which is necessary to its higher transcriptional activity. By ChIP assays we could see that FoxO1 was able to disrupt PPARα interaction from its PPRE (-696;-684) in the human FGF21 promoter region. In summary, FOXO1 was shown to be a PPARα-interacting protein that antagonizes PPARα activity. This inhibition seemed to be achieved by disrupting the DNA binding activity of a PPARα:RXRα heterodimeric complex, and transrepressing PPARα transactivation via direct protein-protein interactions, similar to what have been seen in the regulation of adipocyte differentiation where activation of FoxO1 facilitated its nuclear redistribution and binding to PPARγ. Because other studied genes that are also PPARα target genes remained unaffected, these results suggest a highly specific mechanism implicated in FGF21 regulation in liver.

P10m-27

Estudio de la lipólisis en explantes de tejido adiposo blanco visceral en ratas con el envejecimiento

Alejandro Fernández Briones, Aurora Salamanca, Brenda Bárcena, Cristina Pintado, Virginia Lopez, Cristina Mora, Antonio Andres y Nilda Gallardo Alpizar

Área de Bioquímica. Facultad de Químicas. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

El tejido adiposo blanco (TAB) juega un papel fundamental en la homeostasis de la energía. Se plantea en la literatura que este tejido en humanos y roedores obesos es disfuncional, que la lipólisis basal está incrementada mientras que la mediada por catecolaminas está disminuida. Por otra parte, la resistencia a la insulina altera la lipogénesis y la supresión de la lipólisis mediada por esta hormona. En este trabajo analizamos la lipólisis basal y la estimulada por isoproterenol, en ausencia y presencia de

insulina, en ratas viejas con resistencia a la insulina. Estudiamos la liberación de glicerol en explantes de TAB de ratas Wistar de 3-, 8- y 24-meses de edad, alimentadas ad libitum o sometidas durante 3 meses a restricción nutricional, tras un ayuno de 36 horas o después de alimentarlas durante 30 o 180 minutos. Además se midieron los niveles de mRNA de genes implicados en este proceso. Los resultados muestran que con el envejecimiento la lipólisis basal disminuye, no se altera la estimulada por isoproterenol y, paradójicamente, el efecto anti-lipolítico de la insulina se incrementa con la edad. Ya que la señalización temprana de insulina es similar en las ratas de 8- y 24-meses, los resultados sugieren la participación de algún factor autocrino/paracrino del TAB en la potenciación del efecto anti-lipolítico de la insulina con el envejecimiento, lo que podría contribuir al incremento en la adiposidad observada en estos animales con la edad.

P10r-28

Alteración de los mecanismos implicados en el transporte de ácidos grasos y glucosa en el corazón con el envejecimiento. Relación con la resistencia a insulina

Cristina Mora, Ramón Ramírez, Aurora Salamanca, Brenda Barcena, Alejandro Fernández, Cristina Pintado, Virginia López, Carmen Arribas, Nilda Gallardo y Antonio Andrés

Grupo de Diabetes, Obesidad y Envejecimiento. Área de Bioquímica. Facultad de Químicas. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

El corazón es un órgano relevante en la homeostasis de la energía que utiliza tanto la glucosa como los ácidos grasos para la producción de ATP. Estos sustratos son transportados al interior celular a través de los transportadores GLUT4 y CD36. A pesar de ser las grasas el principal combustible metabólico, la utilización excesiva de éstas a expensas de la glucosa es una condición que caracteriza al corazón de individuos con resistencia a insulina y que conduce a la acumulación indebida de grasas en este órgano. En este contexto, PDK4 (la quinasa inhibidora de PDH) parece jugar un papel fundamental. Por esa razón hemos determinado en corazón, los niveles de mRNA y de proteína de PDK4, Foxo1, CD36 y GLUT4 en ratas Wistar de 3, 8 y 24 meses de edad, alimentadas *ad libitum* o bajo restricción nutricional durante 3 meses. Los ensayos se realizaron en estos animales tras 36 horas de ayuno o posterior realimentación durante 30 o 180 minutos. Los resultados indican que el envejecimiento y la obesidad producen cambios en niveles de mRNA y en el contenido

total de proteínas, así como cambios en la localización de los transportadores GLUT4 y CD36 en diferentes fracciones subcelulares durante el ayuno. La realimentación disminuye, de forma paralela, el contenido de CD36 y PDK4 solo en animales de 3 meses de edad. Los resultados que se muestran sugieren un mayor consumo de ácidos grasos por el corazón con el envejecimiento y la presencia de resistencia a la insulina.

P10m-29

La combinación restricción calórica-tratamiento intracerebroventricular con leptina potencia los efectos metabólicos de esta adipocina en el hígado

Virginia López¹, Aurora Salamanca¹, Alejandro Fernández¹, Brenda Barcena¹, Cristina Mora¹, María Rodríguez², Cristina Pintado¹, Carmen Arribas², Nilda Gallardo¹ y Antonio Andrés¹

¹Área de Bioquímica. Facultad de Químicas. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real,

²Facultad de Bioquímica y Medio Ambiente. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

Este estudio compara los efectos de la administración central de leptina (7 días, 0.2 mg/día) sobre el peso corporal, la ingesta, la expresión de genes y los niveles de proteínas del metabolismo energético del hígado. Se realizó en ratas Wistar de 8 meses de edad, alimentadas ad libitum (hiperleptinémicas) (8mAL) o sometidas a restricción calórica durante 3 meses (niveles normales de leptina en sangre) (8mFR). Los animales PF (pair-feeding) de 8mAL recibieron suero salino y la misma cantidad de comida que ingerían los del grupo con leptina. El último día se administró insulina endovenosa (10 U.I / Kg de peso corporal) a todos los animales y a los 30 minutos fueron sacrificados. Se determinó la concentración en plasma de glucosa y TAG en ayunas. Se aisló RNA total de hígado y se midieron los niveles de mRNA de: Pck1, GK, HK, G6Pasa, IRS-1, IRS-2, L-PK, Scd-1, ACC, FAS, ACL, SREBP-1c, ChREBP, Foxo1 y Foxa2 mediante PCR en tiempo real. En extractos totales de hígado se determinaron los niveles de proteínas relacionadas con la lipogénesis (ACL, ACC) y con la gluconeogénesis (Foxo1, PEPCK) mediante Western-blots. La leptina no tuvo efectos sobre el peso corporal y la ingesta en las ratas de 8 meses restringidas (8mFR), aunque sí modificó el contenido de TAG plasmáticos y hepáticos en estos animales. En animales AL y FR, la leptina redujo los niveles de enzimas lipogénicas (ACL y ACC) siendo los efectos más pronunciados en los animales restringidos. Por otra parte la leptina incrementó los niveles de proteína de Foxo1 y

PEPCK en ambos grupos de animales. En las ratas restringidas (FR) se potenciaron los efectos metabólicos de la leptina sin afectar al peso corporal.

P10m-30

Estrogen related receptor (ERR) α -dependent activation of mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) by PGC-1 β

Mar Gacias Monserrat, Joana Relat Pardo, Albert Pérez Martí, Magdalena Pujol Vidal, Pedro F. Marrero González y Diego Haro Bautista

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona & Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona

The carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) is one of several closely related mitochondrial-membrane carrier proteins that shuttle substrates between cytosol and the intramitochondrial matrix space. This protein mediates the transport of acylcarnitines into mitochondrial matrix for their oxidation by the mitochondrial fatty acid-oxidation pathway. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency can cause a variety of pathological conditions such as hypoketotic hypoglycemia, cardiac arrest, hepatomegaly, hepatic dysfunction and muscle weakness, and it may be lethal in newborn and infants. Here we report that the expression of the CACT gene is induced in mouse skeletal muscle after a 24 h starvation period. To gain insight in to the control of CACT gene expression, we examined the transcriptional regulation of the mouse CACT gene. We show that the 5'-flanking region of this gene is transcriptionally active and contains a consensus sequence for the estrogen-related receptor (ERR) a member of the nuclear receptor family of transcription factors. This sequence is able to bind ERR α both in vivo and in vitro and is necessary for the activation of CACT expression by the PGC-1/ERR axis. We also show that the inverse agonist of ERR α XTC790 specifically blocks the activation of CACT by PGC-1 β in C2C12 cells.

P11. Biotecnología Molecular

P11-1

Aislamiento y caracterización molecular de *Azospirillum* sp. mediante rep-PCR y ERIC-PCR y su evaluación como potencial biofertilizante en plántulas de maíz

Fabian Galvis Serrano

Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Santander, Cucuta, (Colombia)

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera de la planta favoreciendo su crecimiento y desarrollo. En este trabajo se caracterizaron mediante rep-PCR y ERIC-PCR 11 aislados de *Azospirillum* sp., que habían sido identificados previamente con pruebas directas y bioquímicas. Los perfiles observados con cada uno de los marcadores utilizados mostraron una gran variabilidad dentro del género, lo que permitiría explicar la posibilidad que tiene *Azospirillum* sp. de adaptarse a diferentes hábitats, en rangos de temperatura entre 9 a 28 °C, con fertilización química u orgánica y la relación que establece en vida libre con diferentes cultivos. A pesar de la enorme variabilidad genética presentada se pudo establecer entre algunos aislados agrupados en el análisis molecular, la correlación con las características observadas en las pruebas bioquímicas y en el bioensayo. Los aislados SRVP3, SRZP6 y SRZP11 agrupados con un 100% de similaridad en el análisis filogenético con el cebador BcRep, presentaron los mejores resultados en el bioensayo: 100% de germinación, mayor longitud en tallo y raíz, y mayor cantidad de hojas y peso seco.

P11e-2

Actividades divergentes de dos ribonucleasas citotóxicas sobre el crecimiento celular

Jessica Castro Gallegos, Marc Ribó Panosa, Maria Vilanova Brugués y Antoni Benito Mundet

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Gerona, Gerona

PE5 es una variante de la ribonucleasa pancreática humana que incorpora una secuencia de localización nuclear que la dirige al núcleo, donde puede ejercer su actividad ribonucleolítica e inducir la muerte celular. Se ha comparado el mecanismo de citotoxicidad de PE5 y

onconasa, una ribonucleasa con actividad antitumoral que se encuentra en fase III de ensayos clínicos. Los resultados obtenidos muestran que PE5 y onconasa inducen un porcentaje de muerte celular similar, aunque la onconasa presenta la capacidad adicional de parar la proliferación. Se han comparado también los efectos citotóxicos de PE5 y onconasa y se ha estudiado el efecto citostático de ésta última. Para ello se ha determinado el efecto de las dos ribonucleasas sobre el ciclo celular y la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis y el ciclo celular. Los datos obtenidos muestran que PE5 incrementa el número de células en fase S y G2/M al mismo tiempo que aumenta la expresión de la ciclina E y de p21WAF1/CIP1 y disminuye la fosforilación de p46 JNK. Por el contrario, concentraciones citotóxicas de onconasa disminuyen la expresión de XIAP y Bcl-2. Por otro lado, la inhibición de la proliferación inducida por onconasa es consecuencia de una prolongación de la duración global del ciclo asociada a un incremento de la fosforilación de p46 JNK y una disminución de la expresión de las ciclinas D1 y E. Finalmente PE5, pero no la onconasa, disminuye la acumulación de glicoproteína-P en dos líneas celulares multirresistentes. Dicha reducción, que ha sido funcionalmente confirmada por citometría de flujo, podría ser causada por la disminución de la fosforilación de p46 JNK descrita anteriormente. En conjunto, los resultados muestran que PE5 y onconasa inducen la apoptosis a través de mecanismos distintos.

P11-3

Clonación, caracterización y modelado molecular de una Acetil CoA sintetasa de *Oceanobacillus iheyensis* HTE831

Agustín Sola Carvajal, Guiomar Sánchez Carrón, María Inmaculada García García, Sofía Jimenez García, Francisco García Carmona y Álvaro Sánchez Ferrer

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - A, Universidad de Murcia, Murcia

Mediante la comparación de secuencias (BLAST), se ha comprobado que la bacteria extremófila *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 codifica una secuencia para una posible Acetil CoA sintetasa dependiente de AMP (OiAcsA). Esta secuencia ha sido amplificada por PCR y clonada en el vector de sobreexpresión pET24b mediante digestión con enzimas de restricción *NheI* y *NotI*. El vector recombinante se transformó en *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLys para su sobreexpresión. La producción de proteína se llevó a cabo en un fermentador de 4,4 L de medio Terrific Broth (TB) consiguiéndose la sobreexpresión soluble de la

proteína y su purificación mediante cromatografía de afinidad. La proteína pura se utilizó para calcular las características cinéticas, así como su estabilidad a diferentes pHs y temperaturas y para la realización de curvas de melting.

El análisis de la secuencia y el modelado de la estructura tridimensional demostraron que la enzima clonada conserva los dominios catalíticos de la familia dependiente de AMP, así como el dominio característico de desacetilación reversible por sirtuinas (SGKIMR). La comparación de la secuencia obtenida con otras proteínas homólogas ha permitido la realización de un análisis filogenético de las Acetil CoA sintetasas dependientes de AMP.

Nota: Estudio financiado por el MEC (BIO2010-22225-C02-01) y el Programa de Ayuda a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, de la Fundación Séneca (04541/GERM/06, Plan Regional de Ciencia y Tecnología 2007-2010). A.S.C y M.I.G.G son becarios predoctorales asociados al Programa de Ayuda a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia. G.S.C es becaria predoctoral del Ministerio de Educación (FPU). S.J.G es personal de apoyo a la investigación contratado por la Universidad de Murcia.

P11-4

Regulación coordinada por cianuro y *cioR* sobre un supraoperón de función mixta que incluye el operón *cio1* (citocromo *bd*) de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

María Isabel Carmona, Felipe Acera, María Isabel Guijo, Rafael Blasco y Alberto Quesada

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Cáceres

La bacteria cianotrófica *Pseudomonas pseudoalcaligenes* presenta en su genoma tres operones *cio* que codifican el citocromo *bd* responsable de la respiración resistente al cianuro. Los tres operones *cio* están regulados diferencialmente, siendo la expresión de *cio1* esencial e inducible en medios con cianuro. El operón *cio1* está agrupado con *cioR*, un gen regulador de la subfamilia *mocR/gntR*, y con una serie de genes que codifican enzimas de las rutas biosintéticas de His, Lys, Cys y Met, finalizando en el gen para la 3-ciano-Ala-Nitrilasa. El mapa de transcritos de esta región genómica consta de 9 unidades transcripcionales independientes, correspondientes a 10 genes distintos. De manera similar a *cio1*, la expresión de los 9 mRNA identificados se regula de manera positiva por la adición de cianuro al medio de cultivo, lo que sugiere la

existencia de una conexión funcional que define un supraoperón de función mixta. Por otra parte, la mutagénesis dirigida del regulador *cioR* provoca la desrepresión de *cioI* y de todos los genes del supraoperón lo que indica su posible papel como represor transcripcional. Como resultado, el mutante *CioR* sobreexpresa la respiración resistente a cianuro conducida por el citocromo *bd*.

Nota: Agradecimiento. M.I. Carmona es becaria del programa FPI del MICINN. Este trabajo se ha financiado con los proyectos del MICINN (BIO2008-04542-C02-02), Junta de Extremadura (PRI07A097) y FEDER 2007-2013.

P11-5

In vitro immobilization of proteins to polyhydroxyalkanoates by the N-terminal domain of PhaF phasin from *Pseudomonas putida* (BioF tag): A stability study

Daniel Bello Gil¹, Beatriz Maestro¹, M. Auxiliadora Prieto² y Jesús M. Sanz Morales¹

¹*Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Alicante,* ²*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid*

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are lipid-coated biodegradable polyesters accumulated in the cytoplasm of certain bacteria as carbon/energy reserve material. One promising field of application of these biopolymers comprises its utilization as biodegradable, environmental-friendly biomaterial for protein immobilization. The N-terminal of the PhaF phasin (a PHA-granule-associated protein) from *Pseudomonas putida* KT2442 was described previously as a polypeptidic tag (BioF) to in vivo immobilize fusion proteins to PHAs (Moldes *et al.*, 2004). The present work evaluated the in vitro binding of PhaF and two fusion proteins tagged to BioF (FLyt and BioF-βGal, containing the choline-binding module C-LytA and the β-galactosidase, respectively), to different preparations of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxyoctanoate (PHO). PhaF, FLyt and BioF-βGal were capable of binding to artificial preparations of PHB and PHO with different coatings, demonstrating that binding through BioF was not only exclusive to native granules of medium-chain length PHAs. Moreover, binding to lipid-free PHB was found more robust than binding to preparations of PHB coated with oleic acid or phospholipids. On the other hand, degradability of PhaF and FLyt diminished when the proteins were bound to the bioplastics. Finally, immobilized BioF-βGal on PHB showed a very stable enzymatic activity after 15 continuous cycles at room temperature, demonstrating the potentialities of the BioF tag for construction of enzymatic bioreactors.

P11r-6

Fotoproducción de hidrógeno en *Chlamydomonas*

Jose Luis Jurado Oller, David González Ballester, Aurora Galván Cejudo y Emilio Fernández Reyes
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Córdoba

El uso de combustibles fósiles como fuente de energía es el principal responsable del calentamiento global y de otros muchos problemas medioambientales. Existe un esfuerzo por desarrollar energías limpias y renovables que disminuyan la dependencia energética de combustibles fósiles. El hidrógeno (H₂) está creando grandes expectativas ya que el único producto resultante de su combustión es el agua. El uso de microorganismos fotosintéticos es considerado como una posibilidad para producir H₂ de forma barata y eficiente, siendo el alga verde unicelular *Chlamydomonas* uno de los modelos más utilizados para la fotoproducción de H₂. Esta alga posee en condiciones de anaerobiosis una actividad hidrogenasa capaz de generar H₂ y que usa para ello la energía liberada, bien del flujo de electrones del aparato fotosintético, o bien de la degradación fermentativa de algunos metabolitos como el almidón. Además, la producción de H₂ se ve favorecida en déficit de azufre probablemente debido a que promueve la disminución de la actividad fotosintética lo que en último lugar causa anaerobiosis. Desafortunadamente, la producción de H₂ por parte de *Chlamydomonas* es un proceso transitorio y poco eficaz que requiere de un mayor conocimiento de las bases fisiológicas y metabólicas que gobiernan este proceso. En este sentido, nuestros estudios se basan en analizar como la actividad fotosintética y los metabolismos del almidón y del azufre influyen en la producción de H₂. Para ello, diversas colecciones de mutantes insercionales han sido escrutadas para la obtención de mutantes afectados en estos procesos. Parámetros fotosintéticos, niveles de almidón y producción de H₂ están siendo analizados para cada uno de estos mutantes, así como los genes afectados en cada uno de ellos.

P11r-7

La resistencia a arseniato de *Corynebacterium glutamicum* es debida a la presencia de tres arseniato reductasas pertenecientes a dos familias diferentes

Almudena F. Villadangos, Graciela Alonso, Jose A. Gil y Luis M. Mateos

Departamento de Biología Molecular. Área de Microbiología. Universidad de León, León

Las arseniato reductasas (ArsC) son proteínas que participan en la defensa a arseniato [As(V)] en numerosos organismos. En base a su mecanismo de acción las arseniato reductasas de procariotas se agrupan dentro de tres familias diferentes: (i) las dependientes de glutatión (GSH) y glutarredoxina (Grx); (ii) dependientes de tioredoxina (Trx) y tioredoxina reductasa (TrxR) y (iii) dependientes de miotiol (MSH) y micorredoxina (Mrx). *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo saprófito que exhibe una elevada resistencia a arsénico en comparación con el resto de microorganismos analizados. Esta resistencia está asociada a la presencia de dos operones cromosomales de resistencia a arsénico que contienen tres genes para ArsCs; un cuarto gen para una ArsC adicional está también incluido en el genoma de *C. glutamicum* y alejado de los otros tres. Análisis in vivo mediante *western blot* han permitido identificar tres de las cuatro ArsCs de *C. glutamicum*. Las proteínas ArsC1 y ArsC2 han sido expresadas en condiciones de inducción con As y a un elevado nivel, a diferencia de ArsC1' cuya expresión se produce de forma constitutiva y a un nivel bajo. Estudios in vivo e in vitro han mostrado que las arseniato reductasas ArsC1 y ArsC2 son las principales proteínas responsables de la reducción de As(V) en *C. glutamicum* y se acoplan al sistema redox MSH/Mrx. La proteína ArsC1' presenta una actividad residual in vivo debido a su bajo nivel de expresión, y se acopla al sistema Trx/TrxR con un valor de K_{cat}/K_M de tres órdenes de magnitud mayor en comparación con ArsC1 y ArsC2. La expresión constitutiva de la proteína ArsC1' podría ser el agente desencadenante del proceso de inducción de los genes de los operones *ars* en *C. glutamicum* en presencia de As(V).

Nuestro grupo de investigación ha identificado tres proteínas del plasma seminal ovino (RSVP14, RSVP20 y RSVP22), sintetizadas exclusivamente en las vesículas seminales, que poseen la capacidad de reparar y prevenir los daños ejercidos a los espermatozoides por un choque térmico por frío (Barrios et al. 2005; Barrios et al. 2000; Fernández-Juan et al. 2006). La posibilidad de utilizar estas proteínas como agentes crioprotectores depende de la disponibilidad de las mismas, aspecto que entraña una dificultad considerable debido a varias razones. La concentración de estas proteínas en el plasma seminal es muy baja y está condicionada por la estacionalidad reproductiva del ovino (Martí et al., 2007; Cardozo et al., 2006). Además, existe una gran variabilidad individual en la composición del plasma seminal y la alta hidrofobicidad de estas proteínas hace que su purificación, a partir del propio plasma seminal, sea compleja y con un rendimiento muy escaso. Por ello, el objetivo de este trabajo es su expresión in vitro. A partir de RNA de vesícula seminal ovina se obtuvieron los cDNAs mediante transcripción reversa (RT). Las secuencias de DNA correspondientes a las proteínas de interés se amplificaron mediante PCR con oligonucleótidos específicos y se insertaron en plásmidos que posteriormente se clonaron en bacterias. La expresión de las proteínas se llevó a cabo en un sistema combinado de traducción y expresión en un extracto de células de insecto. La detección de las proteínas RSVP14, 20 y 22 se realizó mediante Western Blot con anticuerpos policlonales generados, previamente, en conejo.

Nota: Financiado por IUCA, CICYT-FEDER AGL2010-18975 y DGA A26/2010.

P11-8

Clonaje y expresión de proteínas con capacidad protectora del daño térmico por frío (RSVP14, RSVP20 y RSVP22)

Edith Serrano Blesa¹, Natalia Guillén², Roberto Beamonte², Lucía Calleja¹, Jose Álvaro Cebrían-Pérez¹ y M^a Teresa Muño-Blanco¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular - IUCA, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza, Zaragoza

El proceso de criopreservación altera de forma drástica la calidad y funcionalidad de los espermatozoides de ovino.

P11r-9

Comparación entre dos métodos de funcionalización de nanopartículas de oro con una superóxido dismutasa

Paula Ciaurriz¹, Edurne Teiletxea Malda¹, Luis Olangua¹, Jose F. Morán² y Aaron C. Asensio¹

¹FideNa (Fundación I+D en Nanotecnología), Pamplona, ²Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Pamplona

La conjugación de nanopartículas de oro (AuNPs) con proteínas/enzimas, nos permite diseñar nano-máquinas con gran cantidad de aplicaciones en biotecnología, medicina y catálisis. En todos los casos es muy importante la retención de la estructura y función de la proteína [1,2]. En este trabajo se pretende comparar dos métodos de unión de un enzima, la hierro superóxido dismutasa del vegetal cowpea

(VuFeSOD) a AuNPs de 17 nm, una proteína muy estable y de estructura conocida [3]. Los enzimas Superóxido Dismutasas (SODs) catalizan la dismutación del radicales superóxido (O₂⁻) a H₂O₂. Los O₂⁻ y las SODs están implicadas en procesos de estrés, envejecimiento y enfermedades degenerativas [4]. Por su parte las AuNPs presentan una gran bio-compatibilidad y capacidad para combinarse con biomoléculas de manera sencilla [5]. Para ello se han utilizado diversas concentraciones de ácido mercaptoundecanoico (MUA) para recubrir la superficie de las AuNPs y unir, mediante interacciones electrostáticas y covalentes, el enzima. Posteriormente, se evalúa la proporción de proteína/AuNP, la actividad y la estabilidad del complejo frente a pH y sales, mediante dispersión de luz dinámica (DLS), medidas de ζ-potencial, espectrofotometría UV-VIS, microscopía electrónica de barrido SEM y electroforesis en gel de agarosa.

- [1] M.Srinivas *et al.* *Adv Drug Del Reviews* 2010; 62: 1080.
 [2] M-E Aubin-Tamet *et al.* *Biomed Mat* 2008; 3: 034001.
 [3] Muñoz, I.G *et al.* *Acta Cryst Sect D Biol Cryst* 2003; 59: 1070.
 [4] McCord *et al.* *Biomed & Pharmacotherapy* 2005; 59: 139.
 [5] Angshurman Pal *et al.* *Colloids and Surfaces A. Physicochem Eng Aspects* 2007; 302: 51.

Nota: Agradecimientos: Fiden/UPNA: Contrato OTRI 2010-800-156. Gob. de Navarra: proyecto SABiO, IQ14076.R1.

P11-10

La validez de la técnica de *phage-display* en cuestión: reconocimiento de falsos positivos y métodos para minimizarlos

M^a José Rodes Martínez, Daniel Bello Gil, Gracia Retamosa Hernández y Jesús Miguel Sanz Morales

Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Elche

En 1985 G.P. Smith *et al.* describieron la técnica de *phage-display* para la búsqueda de ligandos peptídicos con alta afinidad hacia una gran variedad de sustratos como proteínas, enzimas, anticuerpos y otras moléculas no proteicas. Una librería de *phage-display* es una mezcla de fagos que llevan anclados péptidos al azar en proteínas de su superficie. Los fagos de la librería se incuban con la molécula diana inmovilizada en condiciones restrictivas, de manera que sólo unos pocos se unen con alta afinidad a través del péptido mostrado en superficie, y serán los fagos

seleccionados. Sin embargo, en la literatura se han descrito falsos positivos debido a la unión inespecífica de fagos a diferentes componentes del sistema de selección utilizado o a ventajas en su velocidad de propagación. Estos fagos contienen en su secuencia los denominados "péptidos no relacionados con la diana" (TUP, *target-unrelated peptides*). Reconocer y evitar estos falsos positivos es muy importante para garantizar la integridad de la técnica de *phage-display*. En esta comunicación mostraremos diferentes experimentos de *phage-display* realizados con diversas dianas, soportes de inmovilización y métodos de selección, en los que hemos obtenido secuencias de péptidos que ya habían sido identificadas en otros sistemas de selección completamente diferentes, o directamente descritos como TUP (<http://pepbank.mgh.harvard.edu>). Además, hemos diseñado nuevos métodos de selección mucho más restrictivos que los iniciales, que nos han permitido eliminar una gran proporción de TUP. Nuestros resultados sugieren que hay que ser tremendamente crítico con los péptidos identificados por *phage-display* y comprobar que no se encuentran en las bases de datos de TUP o en otras publicaciones.

P11-11

Dendrímeros como nanopartículas biomiméticas para la inmovilización específica de proteínas utilizando módulos de unión a colina

Víctor Manuel Hernández-Rocamora¹, Beatriz Maestro García-Donas¹, Sanne Reulen², Bas de Waal², María Morales³, Pedro García³, E.W. Meijer², Maarten Merkx² y Jesús M. Sanz Morales¹

¹*Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Elche,* ²*Laboratory of Chemical Biology, Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, Eindhoven (Netherlands),* ³*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid*

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es uno de los mayores patógenos a nivel mundial. Esta bacteria contiene múltiples copias de colina en su pared celular que sirven como sitio de unión de las proteínas de unión a colina (CBP), implicadas en procesos esenciales para su virulencia. Todas las CBP contienen un módulo de unión a colina (CBM) que dirige la adsorción de la proteína a la superficie bacteriana. Con el objetivo de emular la estructura de la pared neumocócica, hemos sintetizado dendrímeros de poli(propilénimina) derivatizados con colina, observándose una afinidad frente a CBM 10.000 veces superior a la colina libre [1]. A su vez, los dendrímeros son inhibidores muy eficaces de la actividad

enzimática de las CBP in vitro (compitiendo con la pared celular) e in vivo (impidiendo la separación de las células hijas tras la división celular).

Aprovechando las ventajas de la fortaleza y especificidad de la interacción entre dendrímeros de colina y los CBM, hemos construido como prueba de concepto una fusión entre el módulo de unión a colina C-LytA y la proteína de unión a colágeno CNA35 de *Staphylococcus aureus* [2]. Esta quimera se une a dendrímeros de colina etiquetados con fluoresceína con alta afinidad, generando complejos no covalentes que se utilizaron para visualizar muestras de tejidos con colágeno mediante microscopía de fluorescencia.

En resumen, los CBM pueden utilizarse para la inmovilización específica, y no covalente de proteínas y péptidos en dendrímeros biomiméticos para crear nanomateriales bioactivos con aplicaciones tales como el desarrollo de nuevos antibióticos, visualización de tejidos y la creación de vehículos para la distribución in vivo de proteínas.

[1] *Angew Chem Int Ed* 2009; 48: 948-951.

[2] *Chem Commun* 2011; 4: 5997-5999.

P11r-12

Aislamiento de microorganismos productores de poli(R)-hidroxialcanoato despolimerasas: Caracterización del enzima de *Streptomyces roseolus* SL3

Joana Gangoiti, Marta Santos, María Jesús Llama y Juan Luis Serra

Grupo de Tecnología Enzimática y Celular. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa

Actualmente existe un creciente interés científico e industrial en el estudio de polímeros biodegradables como alternativa a los plásticos derivados del petróleo. En este sentido, se han desarrollado varios poliésteres alifáticos biodegradables producidos tanto a partir de fuentes renovables como de origen petroquímico. En concreto, los poli(R)-hidroxialcanoatos (PHA) son excelentes candidatos para sustituir a los polímeros sintéticos. Estos poliésteres, con propiedades similares a las de los plásticos convencionales, son sintetizados por un gran número de microorganismos en situaciones de estrés nutricional. Los PHA se pueden clasificar en PHA de cadena corta (denominados SCL, con monómeros de 3-5 C) y de cadena media (denominados MCL, con monómeros de 6-14 C). La hidrólisis enzimática de PHA es catalizada por PHA

despolimerasas extracelulares. Como productos de estos enzimas es posible obtener hidroxialcanoatos quirales, monómeros de gran interés en farmacia y biomedicina.

En este trabajo se han aislado nuevos microorganismos degradadores de poli-3-hidroxi octanoato [P(3HO)], pertenecientes en su mayoría al género *Streptomyces*. Además, se ha estudiado la capacidad de estos microorganismos para degradar otros biopolímeros tales como SCL-PHA, policaprolactona (PCL), poliláctido (PLA) y polietileno succinato (PES). Asimismo, se ha purificado y caracterizado la MCL-PHA despolimerasa procedente de uno de los aislados (*Streptomyces roseolus* SL3).

Nota: Proyecto subvencionado por la Comisión Europea (Contrato 026515-2), SAIOTEK 09/NANOMAG y GIU07/55.

P11-13

Clonación, sobreexpresión, purificación y estudio cinético de una nueva Neu5Ac aldolasa de *Lactobacillus antri*

María Inmaculada García García, Guiomar Sánchez Carrón, Agustín Sola Carvajal, Alvaro Sánchez Ferrer y Francisco García Carmona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Murcia

El genoma secuenciado de *Lactobacillus antri* presenta el gen nanA de 828 pb correspondiente a una presunta N-acetilneuraminicoliasa o Nue5Ac aldolasa (NAL). Dicho gen fue clonado en el vector pET 28a y la proteína sobreexpresada en *E. coli* Rosetta 2. El clon que mostró mayor actividad sobre Nue5Ac, fue expresado en medio TB e inducido con 1mM de IPTG durante 12 horas a 30°C. El enzima fue purificado en 2 pasos, que incluyen ultrafiltración y cromatografía de afinidad en una columna HisTrap mediante FPLC, hasta pureza electroforética con un rendimiento de 75%.

Los parámetros cinéticos, V_{\max} y K_M de la enzima purificada fueron para la actividad hidrolasa sobre Neu5Ac de 0.016 $\mu\text{M}/\text{min}$ y 1.1 Mm y dichos parámetros para la actividad sintetasa fueron, sobre N-acetilmanosamina 0.019 $\mu\text{M}/\text{min}$ y 333 mM y para piruvato de 0.016 $\mu\text{M}/\text{min}$ y de 1.1 mM, respectivamente.

Se ha caracterizado el pH óptimo (pH=7), la temperatura óptima (60 °C) de reacción para la síntesis de Neu5Ac con la enzima purificada, así como, su temperatura de Melting y la variación de esta en distintas condiciones.

El enzima clonado pertenece al grupo 3 de la familia de las

NAL, tal y como se desprende del análisis de su secuencia y de su distribución dentro del árbol filogenético.

Nota: Agradecimientos. Este estudio fue parcialmente financiado por MEC (BIO200762510) y Programa de Ayuda Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, de la Fundación Séneca (04541/GERM/06, Plan de Ciencia y Tecnología 2007-2010). M.I.G.G. y A.S.C., son becarios asociados al Programa de Ayuda Grupos de Excelencia de la Región de Murcia. G.S.C. becaria FPU del Ministerio de Educación y Ciencia, España. Agradecemos también a Sofía Jiménez García su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

P11-14

Isoprenoid biosynthesis as a target for the development of new drugs against tuberculosis.

Characterization of the enzymes methylerythritol phosphate cytidylyltransferase and CDP-methylerythritol kinase from *Mycobacterium tuberculosis*

Ferran Moratalla¹, Cristian Obiol-Pardo², Falgàs Cisneros¹, Alex Cordero¹, Andreu Saura¹, Karel de Pourcq¹, Joan Miralles², Jaime Rubio-Martínez² y Santiago Imperial¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, ²Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Barcelona

Tuberculosis is one of the leading infection diseases in humans. Discovering new treatments for this disease is urgent, especially due to the emergence of multiple drug resistant organisms and to reduce the total duration of the current treatments. In *Mycobacterium tuberculosis*, the synthesis of isoprenoids has been reported as an interesting pathway to target and especial attention has been focused on the methylerythritol phosphate (MEP) pathway comprising the early steps of biosynthesis.

In this context, we have studied the enzymes methylerythritol 4-phosphate cytidylyltransferase (CMS) and CDP-methylerythritol kinase (CMK) catalyzing the fourth and fifth steps of the MEP pathway for the biosynthesis of isoprenoid precursors, since so far there is no resolved structure of these proteins in *M. tuberculosis*, and their use as drug targets is therefore seriously limited. We have performed a homology modeling of *M. tuberculosis* CMS and CMK to provide reliable models to be used in structure-based drug design. After evaluating the

quality of the models, the most important sites (conserved and non-conserved) useful for drug discovery and mutagenesis studies were suggested. To validate the model *M. tuberculosis ispD* and *ispE* genes were cloned into expression vectors, the corresponding recombinant enzymes were obtained and the role of key residues analyzed by site-directed mutagenesis.

P12. Genómica y Proteómica

P12-1

Is the half-life of TBCE Δ52-55 involved in Kenny-Caffey Syndrome?

Lorena García Hevia, Juan Carlos Zabala Otaño y Mónica López Fanarraga

Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander

Microtubules are $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers that play an important role in a lot of cellular processes such as cell motility, cell division and intracellular transport. Cofactor E (TBCE) is one of five proteins involved in the pathway leading to correctly folded β -tubulin from folding intermediates, and also involved in regulation of tubulin heterodimer dissociation. A deletion of 12 bp in the human TBCE gene causes the Kenney-Caffey syndrome (KCS), a rare hereditary skeletal disease characterized by dysmorphic features, severe growth retardation, and hypocalcemia with hypoparathyroidism at an early age. Recent studies in our laboratory have lead us to conclude that the mutant TBCE protein is functional and that this disease could result of an increased microtubule depolymerization activity. The aim of this study is to quantify and compare the half-life of the wild type and mutant TBCE proteins.

P12-2

A genome-wide screen for mutants tolerant to cationic drugs reveals genes important for K⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*

Lina Patricia Barreto Parra¹, David Canadell¹, Silvia Petrežsélyová¹, Clara Navarrete², Lydie Marešová³, Jorge Peréz-Valle⁴, Rito Herrera²,

Jesús Giraldo⁵, Iván Olier⁵, Hana Sychrová³, Lynne Yenush⁴, José Ramos² y Joaquín Ariño⁶

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba, ³Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i, Prague (Czech Republic), ⁴Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas UPV-CSIC, Universitat Politècnica de Valencia, Valencia, ⁵Institut de Neurociències i Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ⁶Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma Barcelona, Bellaterra

In *S. cerevisiae* cells, secondary active transport of inorganic ions and diverse nutrients relies on the existence of an electrochemical H⁺ gradient across the plasma membrane, which is generated by the Pma1 H⁺-ATPase. The Trk1 and Trk2 K⁺ uptake systems are believed to be the major consumers of the plasma-membrane potential. K⁺ is the most abundant intracellular cation and is important for modulation of many physiological parameters such as turgor pressure, ionic strength, cell cycle and intracellular pH. We considered that any mutation resulting in alteration of the electrochemical gradient could give rise to anomalous sensitivity to any cationic drug, independently of its toxicity mechanism. Therefore, we screened the *S. cerevisiae* haploid deletion library for mutants showing enhanced sensitivity/tolerance simultaneously to three toxic cations: hygromycin B, spermine and tetramethylammonium. We have isolated 226 mutant strains that displayed altered tolerance to all three drugs (202 hypersensitive and 24 hypertolerant) and more than 50% of them showed a strong or moderate growth defect at limiting potassium. Functional groups such as protein kinases and phosphatases, intracellular trafficking, transcription, cell cycle and DNA processing were enriched. Essentially, our screen has identified a substantial number of genes which have not been previously described to play a role in K⁺ homeostasis. A subset of 27 representative mutants were selected and subjected to diverse biochemical tests that, in some cases, allowed us to postulate the basis for the observed phenotypes.

Nota: Supported by grants BFU2008-04188-C03-01 and EU12009-04147 (SysMo2).

P12-3

Prediction of prion proteins in complete proteomes using probabilistic representations of prionogenic domains

Vladimir Espinosa Angarica¹, Salvador Ventura² y Javier Sancho¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

The formation of amyloid intracellular deposits has been linked to an important group of intrinsic degenerative diseases and transmissible prion-related infections in mammals. The amyloidogenicity and infectivity of prions is strongly influenced by the amino acid composition and physicochemical properties of specific protein domains. These prion-forming domains are low complexity stretches with a high content of glutamine/asparagine and depleted in charged residues and prolines. Much effort has been devoted to unravel the compositional determinants of prionogenic domains and to use such knowledge to identify prions in protein sequence databases. However, the predictive strategies developed so far could not be suitably used to make predictions in complete proteomes and associate compositional determinants to prion activity. In this work we present a computational method to predict prion proteins in complete proteomes using probabilistic representations of Q/N-rich prion domains. We calibrated our model with large datasets of protein sequences and we were able to classify known prions with high precision and accuracy. We used our strategy to scan all the complete proteomes available and we predicted putative prions in proteins from all taxa from viruses and archaea to plants and higher eukaryotes. Our results prove that the majority of genomes contain evolutionarily unrelated proteins with susceptibility to be prions, suggesting that conformational conversion might represent a generic mechanism for regulating protein function. Algorithms to accurately predict prions at large scale could guide experimentalist to reach a deeper understanding of the complex mechanisms underlying prion formation and might pave the way for therapeutic strategies against aggregation diseases.

P12-4

Detection of glioblastoma subtypes based on the expression level of four-genes sets obtained from microarray experiments

Xavier Castells¹, Juan José Acebes², Carles Majós³, Susana Boluda⁴, Margarida Julià-Sapé⁵, Ana Paula Candioti⁵, Joaquín Ariño⁶, Anna Barceló⁷ y Carles Arús⁸

¹Servei de Genòmica, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Departament de Neurocirurgia, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, ³Departament de Radiologia, Institut de Diagnòstic per la Imatge, Centre Bellvitge, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, ⁴Institut de Neuropatologia, Servei d'Anatomia Patològica, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Grup d'Aplicacions Biomèdiques de la RMN (GABRMN), Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ⁶Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ⁷Servei de Genòmica, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ⁸Grup d'Aplicacions Biomèdiques de la RMN (GABRMN), Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Several research teams have proposed in last decade signatures based on gene-expression microarrays to improve glioma, and glioblastoma (Gb), objective stratification into molecular subtypes with differential survival. However, few have produced simple formulas for such discrimination and apparently there is no specific equation for Gb.

On these grounds, we conducted an unsupervised analysis to select probesets among Gbs from our local dataset ($n=47$). We used this signature to split cases by hierarchical clustering into one group with higher average intensity (GHE) than the other one (GLE). Discriminant probesets represented several collagen isoforms and genes encoding plasma membrane proteins. A discriminant equation fitted with the four most discriminant probesets accurately

classified Gbs from ours and an independent dataset. Features from GHE and GLE seem to agree with the ones previously described for primary and secondary Gbs, respectively, but these two subgroups did not display a differential survival time.

We repeated this approach using two published signatures that were proposed for Gb distinction. Unlike the result obtained with our local signature, equations fitted in our local dataset using probesets from these two signatures were able to distinguish two Gb groups with differential survival. These probesets represent genes involved in cell proliferation and growth. The simultaneous use of both equations split cases into three survival groups. We validated these three survival groups using two fully independent datasets.

Our work provides a set of equations with validated high performance to discriminate Gbs into groups with differential clinical features. We thoroughly describe required steps for other groups to easily test the performance of those equations.

P12-5

Identificación de proteínas portadoras del epitopo CDw75 en tejido normal y tumoral de cáncer colorrectal humano

Óscar Mariño Crespo¹, Susana Villar Portela¹, María Martínez Amorín¹, David Iglesias Diz², Emilio Gil Martín¹ y Almudena Fernández Briera¹

¹Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Vigo, ²Servicio de Cirugía, Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, Ourense

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia que ocupa el primer puesto por incidencia y el segundo por mortalidad a nivel europeo.

La hipersialilación se asocia con el incremento de la capacidad metastásica en CCR. El antígeno CDw75 [NeuAcα(2,6)Galβ(1,4)GlcNAc] es un epitopo sialilado de la fracción oligosacáridica de glicoproteínas, en cuya síntesis interviene la enzima β-galactosil α(2,6)sialiltransferasa (ST6Gal I; EC 2.4.99.1). El CDw75 se ha estudiado en linfomas y algunos tumores sólidos, pero apenas en CCR. Nuestro grupo ha constatado que tanto la expresión de CDw75 como la actividad ST6Gal I están incrementadas en tejido tumoral con respecto a la mucosa normal de CCR. Sin embargo, nada se sabe de las proteínas que lo portan, por lo que la identificación de éstas arrojará luz sobre la patogénesis molecular de la enfermedad y puede que posibilite el desarrollo de nuevos marcadores para su diagnóstico y/o pronóstico.

A tal fin hemos realizado una separación 2-DE de la fracción proteica asociada a membrana de biopsias de pacientes con CCR sometidos a resección quirúrgica en el Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, seguida por un análisis MALDI-TOF/TOF de los spots proteicos que mostraron inmunoreactividad anti-CDw75 positiva en inmunoblots de los mismos especímenes.

Nuestros resultados sugieren que la haptoglobina y las citoqueratinas 8 y 18 son glicoproteínas portadoras de CDw75 en el tejido colorrectal humano. Además, hemos encontrado otras candidatas no descritas como glicoproteínas para las que enunciamos posibles sitios de glicosilación: citoqueratina 19, proteína restringida a la membrana de los linfocitos, proteína ribosómica SA, proteína de 78 kDa regulada por glucosa y proteína 44 residente del retículo endoplasmático.

P12r-6

Proteomic analysis of the outer membrane subproteome of *Stenotrophomonas maltophilia* by two-dimensional gel electrophoresis and LC-MS/MS

Gerard Torrent¹, Elias Mongiardini¹, Mario Ferrer-Navarro¹, Raquel Planell¹, Pol Huedo¹, Paula Martínez¹, Isidre Gibert¹ y Xavier Daura²

¹Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès,

²Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona. Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Barcelona

Stenotrophomonas maltophilia is a gram-negative nosocomial pathogen. It has been associated with several clinical syndromes, primarily in relation to the opportunistic infection of immunocompromised patients. Although not an inherently virulent pathogen, its ability to colonize respiratory-tract epithelial cells and medical-device surfaces makes it a ready colonizer of hospital settings. Besides more specific resistance mechanisms, its capacity to form biofilms confers the bacterium additional protection in front of the immune system, antibiotics and disinfectants. Outer membrane proteins (OMP) of gram-negative bacteria play a key role in pathogenic bacteria during infection mechanisms and in resistance against antimicrobial agents. Proteins located on the outer membrane interact directly with the cell surface of the cell host. Some of these proteins act as adhesins while others act as receptors to facilitate the colonization as well as mediate the acquisition of nutrients or other molecules from this restricted niche. Here we present the analysis of the purified OMP of two different strains of *S. maltophilia*; a collection

strain and a newly clinical isolate. Two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS have been the methods of choice to identify the components of this subproteome. The analysis of the OMP and the comparison between strains with different infectivity capabilities shall provide a further understanding and identification of new targets for vaccine development and drug therapy.

Note: Acknowledgements: This project is supported by funding under Subprograma de proyectos de investigación fundamental from Ministerio de Ciencia e Innovación (Ref.: BFU2010-17199) and the Seventh Research Framework Programme of the European Union (ref. HEALTH-F3-2009-223101).

P12r-7

Análisis proteómico en suero para la discriminación precoz entre los pacientes con recurrencia leve y progresiva de la hepatitis C tras el trasplante hepático

Santi Marfa¹, Gregori Casals¹, Guillermo Fernandez-Varo¹, Zoe Mariño², Laura Mensa², Xavier Fornés², Manuel Morales-Ruiz¹, Miquel Navasa² y Wladimiro Jimenez³

¹Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona,

²Unitat Hepàtica, Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBERehd, Barcelona,

³Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona
Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Barcelona, Barcelona

Introducción: La enfermedad hepática provocada por el virus de la hepatitis C (VHC) es la causa más frecuente de trasplante hepático (TH). Un tercio de los pacientes trasplantados presentan un curso acelerado de recurrencia de la hepatitis C en los primeros 5 años. La detección precoz de estos pacientes es importante para adoptar decisiones terapéuticas más personalizadas.

Objetivo: Facilitar la identificación precoz de pacientes que presentarán recurrencia leve o progresiva de la hepatitis C después del TH.

Material y métodos: Muestras de suero de pacientes con VHC fueron recogidas seis meses después del TH. Los pacientes fueron clasificados como "fibrosadores" lentos o rápidos en función de la biopsia hepática y el gradiente de presión venosa hepática realizados un año después del TH. Las muestras de suero de 10 fibrosadores lentos y 10 fibrosadores rápidos se fraccionaron y se analizaron

mediante SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization Time-of-Flight). Además, 10 pacientes sometidos a tratamiento antiviral antes del TH y que no tuvieron recurrencia del VHC fueron incluidos como grupo control.

Resultados: Mediante la tecnología SELDI-TOF se identificaron seis proteínas asociadas a la distinta progresión de la fibrosis. Por otra parte, se generó un árbol de clasificación para discriminar correctamente todos los pacientes control, fibrosadores lentos y fibrosadores rápidos.

Conclusión: El análisis de perfiles proteicos en suero mediante el sistema SELDI-TOF es una herramienta útil y no invasiva para la identificación precoz y predicción de la progresión de la fibrosis hepática tras el TH en pacientes infectados con VHC.

P12-8

Expresión heteróloga del agrupamiento de resistencia a arsénico *acr3-arsC* de *Mycobacterium tuberculosis* en *Corynebacterium glutamicum*

Graciela Alonso, Almudena F. Villadangos, José A. Gil y Luis M. Mateos
Universidad de León, León

Corynebacterium glutamicum es una actinobacteria que presenta una elevada resistencia a las dos especies inorgánicas de arsénico (As) más ubicuas en la naturaleza: el arseniato (AsV) y el arsenito (AsIII). Esta resistencia se debe básicamente a la presencia de dos operones cromosomales *ars* que codifican para proteínas metalorrepresoras (*ArsR*), para arsenito permeasas (*Acr3*) y arseniato reductasas (*ArsC*). En el caso de las micobacterias, el cual se incluye dentro de las actinobacterias, la resistencia a arsénico de la especie correspondiente es variable según se trate de especies saprófitas o parásitas; los representantes de este último grupo son los menos resistentes al metaloide dado que el habitat que ocupan no lo presentan. En *Mycobacterium smegmatis*, especie de micobacterias de crecimiento lento y no patógena, se ha detectado un operón completo de resistencia a As conteniendo los genes *arsR-acr3-arsC*, siendo las cepas de *M. smegmatis* resistentes a 1 mM de AsIII y 4 mM de AsV. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, se ha detectado un agrupamiento cromosomal 5'*arsR-acr3arsC*3' con alguna diferencia relevante con respecto a lo descrito para *M. smegmatis*. Esta diferencia consistente básicamente en la presencia de un único gen que codifica para las actividades enzimáticas arsenito permeasa (*Acr3*) y arseniato reductasa (*ArsC*). Los niveles de resistencia a As alcanzado por *M. tuberculosis* en

análisis "in vitro" han sido de 0.65 mM para AsIII y 1.25 mM para AsV. El gen correspondiente al clúster 5'*acr3arsC*3' ha sido amplificado por PCR de *M. tuberculosis* y usado para complementar cepas silvestres y mutantes de *C. glutamicum*.

P12-9

Estudio de la expresión diferencial, en condiciones de normoxia e hiperoxia, de un modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila melanogaster*

Sirena Soriano¹, Jose Vicente Llorens², Pablo Calap-Quintana¹, María Jose Martínez-Sebastián¹ y María Dolores Moltó³

¹Universitat de València, Burjassot, ²Universitat de València. Institut de Biomedicina de València, CSIC, Burjassot, ³Universitat de València. CIBERSAM, Burjassot

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la deficiencia de la proteína mitocondrial frataxina. Su función es todavía materia de debate pero predomina la hipótesis de su participación en la formación de los centros Fe-S. En nuestro laboratorio se estableció un modelo de AF en *Drosophila* mediante el silenciamiento por RNAi del gen *frataxin homolog* (*fh*) [Llorens *et al.* 2007]. Estos mutantes funcionales mimetizan los defectos que presentan los pacientes como la disminución de la supervivencia y de la capacidad locomotora, que se agravan en condiciones de elevado estrés oxidativo (hiperoxia), así como la reducción de la actividad de la aconitasa en hiperoxia. Con el objetivo de estudiar los mecanismos moleculares afectados por la falta de frataxina, se ha analizado la expresión diferencial de la cepa mutante *fh*-RNAi respecto del control en condiciones de normoxia e hiperoxia. La fracción enriquecida en proteínas mitocondriales se analizó mediante 2D-DIGE y las proteínas de interés se identificaron mediante MALDI-TOF MS. En condiciones de normoxia se encontraron 93 proteínas diferenciales con una *ratio* de cambio $\geq 1,25$ (46 aumentadas y 47 reducidas en el mutante respecto del control). El análisis mediante huella peptídica de 44 de dichas proteínas permitió identificar 9 proteínas aumentadas y 17 proteínas disminuidas. En cuanto a la hiperoxia, 217 proteínas se encontraban diferencialmente expresadas en mutantes respecto de controles con una *ratio* $\geq 1,25$ (139 aumentadas y 78 disminuidas). Se analizaron 45 de ellas mediante huella peptídica, de las que se identificaron 9 proteínas aumentadas y 26 disminuidas. Finalmente, las proteínas identificadas se agruparon en cuanto a categorías de GO y a las rutas metabólicas implicadas.

P12-10

Expresión y secreción de la serin proteasa Sat en la cepa probiótica *Escherichia coli* Nissle 1917

Laura Aguilera, Lorena Toloza, Josefa Badía, Rosa Giménez y Laura Baldomà

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

La cepa de *E. coli* Nissle 1917 (EcN) es un probiótico intestinal gram-negativo. Su genoma contiene 108 genes específicos que se agrupan mayoritariamente en cuatro grandes islas y son los responsables de su carácter probiótico. Estas islas contienen genes relacionados con la producción de factores fitness que contribuyen a la colonización del intestino humano. La expresión o función de muchas de estas proteínas no ha sido demostrada experimentalmente.

Por su carácter extracelular, las proteínas secretadas por probióticos tienen un papel clave en la interacción con el huésped. En este trabajo se han abordado estudios proteómicos a partir de sobrenadantes de cultivos de la cepa EcN en medio LB para establecer su secretoma. Las proteínas separadas por electroforesis bidimensional han sido identificadas por espectrometría de masas. Entre las proteínas secretadas está Sat, codificada por un gen de la isla II. Sat pertenece a la subfamilia de serin proteasas autotransportadoras de enterobacterias (SPATE) que sufren dos procesamientos proteolíticos durante su exporte.

Ensayos de Western blot con anticuerpos obtenidos frente a un péptido inmunogénico de la fracción secretada de Sat, demuestran la secreción de esta proteína en forma soluble, no asociada a vesículas, en cultivos de la cepa EcN en LB. La expresión de sat ha sido analizada por fusiones de promotor al gen reportero *lacZ*. Se han ensayado diferentes medios de cultivo y condiciones que simulan las del tracto intestinal. Los valores de actividad B-galactosidasa indican que la máxima expresión se produce en medio rico LB. El bicarbonato o las sales biliares no modifican la expresión de Sat, mientras que la adición de mucina tipo II a cultivos de medio mínimo-glucosa induce 2-3 veces la expresión de este gen.

P12-11

TetR-type transcriptional steroid metabolism regulators in the genome of *Rhodococcus ruber* strain chol-4

Juana María Navarro Llorens, Gianluigi Baldassarre, Laura Fernández de las Heras, Oliver Drzyga y Julián Perera

Dpto Bioquímica y Biología Molecular I, UCM, Madrid

Rhodococcus ruber CECT7469 is a cholesterol-degrading strain isolated from a sewage sludge sample from a wastewater treatment plant. This strain is able to grow with many steroids as sole source of carbon and energy (e.g. cholesterol, testosterone, 4-androstene-3,17-dione (AD), 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD), progesterone, androsterone and β -estradiol). Two transcriptional regulators (KstR1 and KstR2) that control the expression of steroids metabolism genes have been so far described in different actinomycetes, and consensus sequences of their DNA binding sites have been proposed. A preliminary sequence determination of the *Rhodococcus ruber* CECT7469 genomic DNA yielded 159 contigs covering around 5.4 megabases. We have searched across the *R. ruber* genome for the presence of these two regulators binding motifs. This study shows that the consensus motif for the binding of KstR1 and KstR2 seems to be extensive for some conservative clusters along actinomycetes. Our data could help to discover genes possibly involved in steroid metabolism of the species *R. ruber*.

P12-12

Analysis of post-translational modifications of porcine haptoglobin and apolipoprotein A-I

Anna Marco-Ramell¹, Laura Arroyo¹, Katharina Nöbauer², Ebrahim Razzazi-Fazeli², Manfred Gemeiner³, Ingrid Müller³ y Anna Bassols¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²VetOMICS Core Facility for Research, University of Veterinary Medicine Vienna, (Austria), ³Department for Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna, (Austria)

Haptoglobin is a positive acute phase protein (APP) found in humans and many animal species. Glycosylation is the most frequent post-translational modification (PTM) of human haptoglobin and it has been shown to be altered in cancer and infectious and inflammatory diseases. Porcine serum was separated in zoom gels of pH-range 4.7-5.7 on medium-size 2-DE gels and haptoglobin spots were identified by immunostaining and by MALDI-TOF/TOF. 2-DE blots of the same pH-range were probed with the lectins wheat germ agglutinin and concanavalin A. Pig serum was also digested with N-glycosidase, separated on 1-DE and 2-DE gels and immunoblotted with porcine anti-haptoglobin. Four spots corresponding to the b-chain and two spots of the a-chain of pig haptoglobin were identified by MS. An antibody against porcine haptoglobin detected the four main spots of the b-subunit. In addition, it gave a weak signal for a spot chain with higher molecular mass. Haptoglobin spot

pattern from overall protein staining was compared to lectin staining with wheat germ agglutinin and concanavalin A, confirming that most spots are glycosylated protein isoforms. Haptoglobin was purified by affinity chromatography on hemoglobin-Sepharose. The purified protein showed a pattern with 4-5 spots with a molecular mass of 42 kDa. After deglycosylation, 5 spots with higher pI and MW 27 kDa were seen. N-glycosidase digestion confirmed that most of the isoforms were N-glycosylated. Apolipoprotein A-I (Apo A-I) is a negative APP. Oxidation is the most frequent PTM of human Apo A-I and it has been shown to be altered in infectious diseases. To confirm that Apo A-I is also oxidized in porcine serum, samples were derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and subjected to 2-DE.

intensidades de los picos en condiciones de hipoxia y normoxia.

Resultados: El análisis proteómico de las muestras individuales se realizó mediante cromatografía de retención de intercambio catiónico (CM10) acoplado SELDI-TOF/MS. Los espectros de masa mostraron cambios significativos en el secretoma de las células AC16 provocados por el tiempo de exposición a hipoxia. Las relaciones masa/carga (m/z) de los picos con significación estadística fueron: 3285, 3807 y 5795.

Conclusión: El análisis proteómico de células AC16 mediante SELDI-TOF/MS permite la identificación de un perfil proteico asociado a la hipoxia celular cardiaca. La identificación de dichas proteínas puede tener utilidad clínica en el diagnóstico de la isquemia cardiaca.

P12-13

Aplicación de la proteómica en la identificación de biomarcadores asociados a la hipoxia celular cardiaca

Gregori Casals¹, Manuel Morales-Ruiz¹, Santi Marfa¹, Sergio Ciordia², Silvia Juarez², Juan Pablo Albar² y Wladimiro Jimenez³

¹Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona,

²Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Madrid, ³Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Barcelona, Barcelona

Introducción: Un factor importante que dificulta el manejo de los pacientes con síndrome coronario agudo es la ausencia de marcadores precoces y específicos de isquemia miocárdica en ausencia de necrosis.

Objetivo: Identificar biomarcadores de hipoxia cardiaca mediante la caracterización del secretoma de cardiomiocitos humanos adultos (células AC16) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Métodos: Células AC16 fueron cultivadas en condiciones de normoxia (21% O₂) o hipoxia (5% O₂) durante 3, 8 y 16 horas. Los sobrenadantes celulares se concentraron mediante centrifugación y la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fue usada como control positivo de hipoxia. La optimización de los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas se realizó analizando mezclas representativas de muestras normóxicas e hipóxicas tomadas a diferentes tiempos. Los sobrenadantes celulares fueron analizados mediante SELDI-TOF/MS (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry) y se compraron las

P13. Metabolismo del Nitrógeno

P13r-1

El enzima con cofactor de Molibdeno crARC tiene una actividad dependiente de Zinc

Alejandro Chamizo Ampudia, Aurora Galvan Cejudo, Emilio Fernandez Reyes y Angel Llamas Azua

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Córdoba

Las proteínas ARC son un grupo de enzimas con Cofactor de molibdeno (Mo) recientemente descubiertas. Estas proteínas catalizan la reducción de una amplia gama de compuestos N-hidroxilados (NHC), entre ellos el análogo de base nitrogenada 6-N-hidroxilaminopurina (HAP) que es un agente tóxico y mutagénico muy potente. Las proteínas ARC se han caracterizado en bacterias y en humanos. En ambos sistemas ARC necesita la participación de otras proteínas que le suministran el poder reductor necesario para la reducción del NHC. En el caso de bacterias se trata de una Flavin Reductasa dependiente de NADPH y en el caso de humanos una Citocromo (Cyt) b5 y una Cyt b5 Reductasa dependiente de NADH.

Hemos estudiado esta proteína en el alga verde *Chlamydomonas*. Hemos clonado, purificado y caracterizado la proteína homóloga en *Chlamydomonas* que hemos denominado crARC. Hemos realizado experimentos tanto in vivo como in vitro que nos confirman que el sistema ARC en *Chlamydomonas* es más semejante al sistema de humanos que al de bacterias, ya que también depende de un Cyt b5 y de una Cyt b5 Reductasa dependiente de NADH.

Al caracterizar enzimáticamente el sistema crARC hemos descubierto que posee una actividad dependiente de Zinc (Zn) que le hace incrementar 10 veces la capacidad de reducción de HAP. El estudio de variantes crARC donde las cisteínas se han sustituido por alaninas nos ha llevado a encontrar que la cisteína 252, que está completamente conservada en todos los miembros ARC, está directamente implicada en la unión de Cofactor de Mo. Por esto proponemos que la proteína crARC pertenece al grupo de las molibdoenzimas del tipo Sulfito Oxidasa.

Nota: Financiado por MCINN (BFU2008-1798), Programa Ramón y Cajal, y Junta de Andalucía (BIO-128 y P08-CV14157).

P13r-2

La bacteria cianotrófica

***Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 puede usar furfural y sus derivados como fuente de carbono**

Daniel Macías Granados, Gracia Becerra León, María Isabel Igeño González y Rafael Blasco Plá
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Cáceres

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344, aislada a partir de lodos del río Guadalquivir (Córdoba) por su capacidad de asimilar altas concentraciones de cianuro (como fuente de N) en condiciones a pH alcalino, lo que evita la volatilización del cianuro en forma de ácido cianhídrico. Puesto que la relación C/N en la molécula de cianuro es muy baja, es necesario añadir una fuente adicional de carbono al medio de cultivo para que la bacteria pueda asimilarlo. El objetivo principal de este trabajo ha sido la búsqueda de fuentes de carbono, asimilables por la bacteria, que supongan un problema de contaminación, como los furfurales. El furfural y sus derivados se generan tras la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, siendo especialmente tóxicos para las levaduras que llevan a cabo la fermentación de los azúcares para la obtención de bioetanol. En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha detectado una agrupación de genes que podría permitirle asimilar furfurales. Los estudios realizados demuestran que *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 no solo es capaz de resistir el efecto tóxico del furfural (40 mM), el ácido furoico (20 mM) y del furfural alcohol (20 mM) sino que puede utilizarlos como fuente de carbono para su crecimiento. Se han puesto a punto las condiciones de cultivo óptimas para la asimilación de furfurales en comparación con otras fuentes de carbono como el

acetato. Así como un método cromatográfico para la determinación de furfural.

Nota: Los autores agradecen la financiación de este trabajo por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-04542-C02-02), la Junta de Extremadura (PRI07A097 y Ayuda a Grupos-BioMic) y FEDER 2007-2013. D. Macías agradece la beca concedida por la Universidad de Extremadura. Los autores agradecen la ayuda técnica de G. Gutiérrez.

P13-3

Expresión in vivo de la nitrito reductasa en la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Maite Buxens Azcoaga, María Jesús Llama Fontal y Juan Luis Serra Ferrer
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad País Vasco, Leioa

Las cianobacterias pueden tomar el nitrógeno necesario para su crecimiento empleando fuentes tanto orgánicas (algunos aminoácidos y urea), como inorgánicas (nitrito, amonio y dinitrógeno). El nitrito es la fuente de nitrógeno más frecuentemente empleada. Cuando este anión entra al interior celular es reducido a amonio por la acción secuencial de las actividades nitrito reductasa (NarB) y nitrito reductasa (NirA).

En este trabajo se ha empleado un sistema heterólogo de expresión en *E. coli* que ha permitido clonar, expresar y purificar la proteína NirA de la cianobacteria termofílica unicelular *T. elongatus* BP-1. En la proteína recombinante purificada (His6NirA) se ha detectado una zona especialmente sensible a la hidrólisis. Durante la purificación de His6NirA se obtiene una proteína de 58 kDa, que se corresponde con la masa teórica de la proteína recombinante intacta, y una forma truncada de aproximadamente 44 kDa. Se ha empleado la proteína recombinante como inmunógeno para obtener anticuerpos policlonales que se han empleado para analizar la expresión in vivo de NirA en cultivos de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 crecidos en distintas fuentes nitrogenadas (amonio, nitrito y nitrito) o sometidos a deficiencia nitrogenada. Así, se han detectado in vivo dos formas de NirA, una correspondiente a la proteína completa de 58 kDa, y otra truncada de la misma de aproximadamente 44 kDa. La presencia de cada una de estas proteínas depende de la naturaleza de la fuente nitrogenada disponible en el medio, predominando la forma completa de 58 kDa cuando las células disponen de nitrito o amonio, y la truncada de 44 kDa cuando es amonio la fuente nitrogenada disponible.

Nota: Trabajo subvencionado por la UPV/EHU (GIU07/55).

P13-4

La proteína NnrR de *Bradyrhizobium japonicum* es el activador transcripcional del gen de la desnitrificación norC

Eloy Robles¹, Sergio Salazar², Tino Krell², María Jesús Delgado² y Eulogio J. Bedmar²

¹CIMA. Universidad de Navarra, Pamplona, ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

En *B. japonicum*, el control de la desnitrificación se lleva a cabo por el sistema FixLJ/FixK₂/NnrR. FixLJ es un sistema regulador de dos componentes en el que FixL es una quinasa capaz de detectar la concentración intracelular de oxígeno, y FixJ es un regulador de respuesta. FixJ activa a *fixK₂* cuyo producto, la proteína FixK₂, induce, a su vez, la expresión de los genes de la desnitrificación. La proteína NnrR, el producto del gen *nnrR*, es un activador transcripcional de la familia Fnr/Crp implicada en la respuesta a óxidos de nitrógeno.

El gen *nnrR* de *B. japonicum* se ha expresado en *E. coli* y su producto se purificó como una proteína soluble. Ni los experimentos de transcripción in vitro ni de retardo en gel han permitido demostrar la unión de NnrR a las regiones promotoras de los genes de la desnitrificación. Sin embargo, la titulación de los fragmentos de DNA correspondientes a las regiones promotoras P_{napE}, P_{mirK}, y P_{norC} de *B. japonicum* mediante calorimetría isotérmica en condiciones aeróbicas resultó en la presencia de picos exotérmicos de tamaño mínimo y uniforme que corresponden a calor de dilución y no al de unión DNA-proteína. Resultados similares se obtuvieron cuando la titulación de P_{napE} y P_{mirKse} llevó a cabo en condiciones de limitación de oxígeno. Sin embargo, la titulación de P_{norC} en condiciones anaeróbicas resultó en la aparición de picos endotérmicos. En este caso, la unión NnrR-DNA estuvo mediada por cambios de entropía favorables y de entalpía desfavorables. La estequiometría de la reacción fue de 1 dímero de NnrR por fragmento de DNA y la constante de disociación de 625 ± 80 nM.

Nota: Este trabajo se ha subvencionado con fondos cofinanciados por FEDER del proyecto CVI-3177 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de Junta de Andalucía.

P13-5

Ensifer medicae es el endosimbionte del trébol andino (*Medicago hispida* G.) de las chacras maiceras andinas

Gregorio J. Arone Gaspar y Eulogio J. Bedmar
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

En el nicho maicero de la región Quechua del Perú, las cosechas de maíz amiláceo dependen de una leguminosa asociada a su cultivo, el trébol andino (*Medicago hispida* G.). Aunque el trébol no se siembra, su emergencia espontánea en las chacras permite la cosecha sostenida de maíz, ya que, en la mayoría de las ocasiones, no se adiciona ningún fertilizante químico nitrogenado. A partir de nódulos de *M. hispida* se obtuvieron 54 UFCs que formaron 31 grupos mediante REP-PCR. La amplificación y secuenciación parcial del gen 16S rRNA de cada una de las cepas representativas de cada grupo REP reveló que 8 cepas (25%) fueron miembros del orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria. La mayoría de ellas (75%) pertenecieron al género *Ensifer*, seguido de los géneros *Kaistia* y *Rhizobium*, cada uno con el 12,5% de las cepas. El 75% de las cepas restantes incluyen bacterias incapaces de formar nódulos. Entre ellas, el 42% correspondió a *Pseudomonas*, el 7% a cada uno de los géneros *Rheinheimera*, *Xanthomonas* y *Stenotrophomonas*, y el 3% a cada uno de los géneros *Achromobacter*, *Duganella*, *Microbacterium* y *Sphingopyxis*. Mientras que *E. medicae* noduló de nuevo a *M. hispida*, no lo hicieron ni *K. granulifera* ni *R. giardinii*. En conclusión, la fertilidad natural de las chacras maiceras de la región Quechua depende de la asociación simbiótica *E. medicae*-*M. hispida*, siendo las leguminosas las que proporcionarían la mayor parte del N necesario para la producción sostenible del maíz amiláceo.

Nota: Este trabajo se ha subvencionado con fondos cofinanciados por FEDER del proyecto RNM4746 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de Junta de Andalucía (España). G. Arone agradece a la Fundación Ford la ayuda IFP N° 15082226.

P13-6

Regulación transcripcional y postraducciona l de la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*

Emanuel Sanz Luque, Francisco Ocaña Calahorro, Amaury de Montaigu, Aurora Galván Cejudo y Emilio Fernández Reyes

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Córdoba, Córdoba*

Para *Chlamydomonas* el amonio es la fuente de nitrógeno inorgánico preferencial debido a su estado reducido y al menor coste energético que supone su asimilación. Cuando el amonio está presente en el medio la ruta de asimilación de nitrato se regula negativamente tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Esta represión responde, al menos a nivel transcripcional, al balance amonio/nitrato existente en el medio. En nuestro laboratorio hemos identificado un mutante que está afectado en una guanilato ciclasa soluble, CYG56, que tiene un papel importante en esta regulación. Esta proteína está implicada en la señalización negativa por amonio formando parte de una vía que implica al calcio, NO y GMPc. Además, hemos observado que la presencia de amonio incrementa los niveles intracelulares de NO y GMPc que desencadenarían los efectos represores sobre la vía de asimilación de nitrato. Usando productos farmacológicos que varían la concentración de GMPc y NO hemos demostrado que el aumento en los niveles de estas moléculas mensajeras está relacionado con la represión de los genes responsables de la asimilación de nitrato. Además de esta regulación transcripcional, el NO regula postraduccionalmente la nitrato reductasa. Igualmente, hemos identificado otro mutante (M42.49), relacionado con esta vía de represión por amonio, que está afectado en una proteína con cierta homología con las proteínas tipo “scarecrow” de *Arabidopsis* y que controla la transcripción de *CYG56*. El cDNA del gen afectado de 521 pb ha sido clonado para su expresión y se ha aislado su secuencia genómica a partir de una genoteca de BACs para la reversión del fenotipo insensible a amonio.

P13-7

Caracterización fisiológica de la familias génicas de transportadores de amonio (AMT) y transportadores de glutamina (GDU) en *Pinus pinaster*

Vanessa Viviana Castro Rodríguez, Javier Canales Carrasco, Concepción Ávila y Francisco Cánovas Ramos

*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica,
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga*

En los bosques de coníferas la mayor parte del nitrógeno inorgánico disponible se encuentra en forma de amonio como fuente primaria de nitrógeno asimilable [1]. El amonio se incorpora por las raíces a través de proteínas de membrana denominadas transportadores de amonio (AMT). Recientemente se han descrito en plantas una

familia de transportadores denominados “glutamine dumper” que son importantes para el transporte intercelular de aminoácidos.

En nuestro laboratorio se ha llevado a cabo estudios de transcriptómica en diferentes órganos de la conífera modelo *Pinus pinaster* y bajo diferentes condiciones nutricionales con amonio como fuente de nitrógeno [2].

Los resultados obtenidos se han recogido en una base de datos denominada EuroPineDB (<http://www.scbi.uma.es/pindb/>) en la que se han identificado isógenos de la familia AMT y GDU. Nuestro grupo ha comenzado la caracterización molecular de estos genes y se han realizado estudios comparados con angiospermas. Como primera aproximación se están determinando los niveles de expresión y la distribución de transcritos en diferentes órganos de la planta. Se realizarán construcciones de las correspondientes proteínas recombinantes para esclarecer los parámetros bioquímicos de las diferentes isoformas mediante expresión heteróloga en levadura.

[1] Cánovas *et al.* *Journal Experiment Botany* 2007; 58: 2307-18.

[2] Canales *et al.* *Amino Acids* 2010; 39 (4): 991-1001.

P13-8

Diseño de un microarray de *Haloferox mediterranei* para análisis de su transcriptoma en función de la disponibilidad de nitrógeno

Mónica Camacho Carrasco, Julia M^a Esclapez Espliego, Carmen Pire Galiana, Vanesa Bautista Saiz, Rosa M^a Martínez-Espinosa, Basilio Zafrilla Requena, Laia Pedro Roig y M^a José Bonete Pérez
Dpto. Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante

El entorno de un cultivo afecta su metabolismo celular. Entre los ambientes característicos destacan las fuentes de carbono y nitrógeno. El nitrógeno es elemento esencial para muchas macromoléculas y componentes celulares. En bacterias se conocen los mecanismos de control para disponer de un aporte óptimo de nitrógeno en su metabolismo celular, y para sobrevivir en limitación de nitrógeno. Sin embargo, el conocimiento de este control en arqueas halofílicas es todavía muy limitado.

Haloferox mediterranei puede utilizar diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico para su crecimiento. Para abordar y actualizar nuestro conocimiento sobre el metabolismo del nitrógeno, se realizó un perfil transcripcional mediante el diseño de un microarray específico para dicho microorganismo. El análisis del transcriptoma se llevó a

cabo en presencia de nitrato, de amonio, o en condiciones de restricción de nitrógeno, para examinar cómo afectaba a la regulación del metabolismo central de este organismo halófilo.

Los resultados obtenidos demuestran que si el nitrato es la fuente de nitrógeno se expresan proteínas que facilitan la entrada de amonio a la célula, sintetizan amonio a partir de nitrato y lo asimilan, principalmente gracias al ciclo GS-GOGAT; en contra de lo que ocurre en presencia de amonio, condiciones en las que éste se asimila preferentemente a través de la GDH. Asimismo se observa un reajuste en la biosíntesis de aminoácidos. Un perfil similar se obtiene en condiciones de restricción de nitrógeno. La proteína PII parece tener un papel fundamental como regulador del metabolismo del nitrógeno, expresándose cuando los niveles de amonio son bajos.

Nota: Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Biotecnología) BIO2008-00082.

P13-9

Utilización de cianato como fuente de nitrógeno por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Lara P. Sáez Melero, Víctor M. Luque-Almagro, Isabel Manso Cobos, Manuel Martínez-Luque, Conrado Moreno-Vivián, M. Dolores Roldán Ruiz y Francisco Castillo Rodríguez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba, Córdoba

La forma reactiva del cianato, el tiocianato, resulta tóxica para los seres vivos porque se une a los grupos amino y tiol de las proteínas y a metales esenciales para las enzimas, inactivándolas. El cianato se genera en grandes cantidades como consecuencia de actividades industriales como la oxidación del cianuro con ozono o la producción de resinas fenólicas, aunque también se produce de forma natural como un intermediario del metabolismo del carbamoil-fosfato y de la urea. Debido a este origen natural, existen organismos que poseen las enzimas necesarias para incorporarlo a su metabolismo y utilizarlo como fuente de nitrógeno. La bacteria cianotrofa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 presenta una agrupación génica, *cynFABDS*, implicada en el metabolismo del cianato, en la cual se ha encontrado un activador transcripcional que responde a la presencia de cianato (CynF), un transportador específico para este anión (CynABD) y una enzima con actividad cianasa (CynS). Por otra parte, el estudio de un mutante *cynBD* ha revelado la existencia de un transportador adicional de cianato que es inducible por nitrato. Finalmente, mediante RT-PCR se ha

realizado un análisis preliminar de la expresión de estos genes, que se organizan en dos unidades transcripcionales divergentes. La expresión de los genes *cynABDS* se induce por nitrato o cianuro y se reprime por amonio.

P13-10

Haloferax mediterranei como agente biorremediador de salmueras con elevadas concentraciones de nitrito

Cindy Nájera, Basilio Zafrilla Requena, Rosa María Martínez Espinosa y María José Bonete

División de Bioquímica y Biología Molecular.

Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante

Haloferax mediterranei es una haloarchaea desnitrificante capaz de crecer en salmueras con una concentración de sal que puede oscilar entre el 15% de sal y saturación, aunque el óptimo de concentración de sal para su crecimiento es 25%. Estudios previos han demostrado que esta haloarchaea tolera la presencia en el medio de elevadas concentraciones de nitrato (hasta 2 M), perclorato y clorato (hasta 100 mM) y nitrito (hasta 50 mM).

En este estudio se ha realizado un análisis detallado de cómo tiene lugar el crecimiento de *Hfx. mediterranei* en salmueras con elevada concentración de nitrito (30-50 mM). Para ello se han preparado cultivos controlados mediante el uso de un quimiostato que ha permitido establecer la tasa de crecimiento, velocidad de consumo de nitrito y velocidad de consumo del oxígeno y el mantenimiento del pH. Los resultados obtenidos indican que este microorganismo es un excelente candidato para el desarrollo de procesos de biorremediación de salmueras ricas en nitrito procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales o urbanas. En relación al proceso de eliminación de nitrito cabe destacar el papel que desempeña la nitrito reductasa respiratoria de *Hfx. mediterranei* (NirK) enzima recientemente caracterizada.

Nota: Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con ayudas a grupos emergentes de la Universidad de Alicante (GRE09-25) y de la Generalitat Valenciana (GV/2011/038).

P14. Neuroquímica

P14-1

Efecto neurotóxico del β -N-metilamino-L-alanina en cultivos neuronales

Begoña G. Miguel¹, Rosa M. Arahetes², Emma Muñoz-Saez¹, Estefanía de Munck², Irene Ojeda² y Ana M. Martínez¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurológica de causa aún desconocida y evolución clínica muy variable, que se manifiesta con degeneración progresiva de las motoneuronas. Se estima que más del 90% de los afectados padece la forma esporádica de la enfermedad que se presenta con una elevada incidencia entre determinados grupos de la población. El denominador común de todos estos casos parece ser el efecto neurotóxico de un aminoácido el β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA). El aminoácido en presencia de bicarbonato genera un aducto carbamylado similar al glutamato, neurotransmisor excitatorio implicado en la patogénesis de la ELA. El L-BMAA llega al cerebro a través del transportador de aminoácidos neutros de la barrera hematoencefálica y actúa sobre los receptores glutamatérgicos: AMPA, NMDA y mGluR1 y en mGluR5. El presente estudio está dirigido a conocer la acción del L-BMAA en diferentes parámetros de la actividad neuronal, utilizando cultivos celulares de neuronas SH-SY5Y. Los resultados obtenidos indican, en primer lugar, que el L-BMAA produce un descenso significativo de la viabilidad neuronal, el cual depende de la dosis utilizada. Experimentos llevados a cabo en presencia de inhibidores específicos demuestran la implicación de diferentes isoformas de PKC en la viabilidad de estas neuronas, concretamente las isoformas PKC ζ y PKC δ fundamentalmente. Asimismo, se puede concluir que el tratamiento con L-BMAA da lugar también a un importante incremento en la producción de ROS y de calcio citosólico. También se ha detectado despolarización de la membrana mitocondrial y variación de los niveles de calcio intramitocondriales. Estos efectos son compatibles con las disfunciones que se detectan en los enfermos de ELA y pueden representar un punto de partida para validar un modelo de estudio de la enfermedad.

P14r-2

El tráfico constitutivo del transportador de glutamato GLT1 es dependiente de la ubiquitinación / desubiquitinación de su extremo carboxilo

Jaime Martínez de Villarreal, Noemí García-Tardón, Ignacio Ibáñez, Francisco Zafra Gómez y Cecilio Giménez Martín

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central. Cuando es liberado a la hendidura sináptica interacciona con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la neurona postsináptica. Una sobrestimulación de estos receptores puede conducir a muerte neuronal por excitotoxicidad, proceso asociado a numerosas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer o a procesos patológicos como la isquemia. Existen cinco transportadores de alta afinidad específicos de glutamato localizados en la membrana plasmática de astrocitos y neuronas encargados de llevar a cabo la retirada del neurotransmisor. Desde el punto de vista cuantitativo, EAAT2 o GLT1, una proteína eminentemente glial, es el más importante de ellos ya que lleva a cabo el 90% de la recaptura de glutamato en el cerebro anterior. La función de GLT1 depende de su concentración en la membrana plasmática de los astrocitos, determinada a su vez por la magnitud del tráfico intracelular hasta y desde la membrana. Este tráfico puede ser constitutivo o regulado por diversos efectores celulares. En el presente trabajo se demuestra como el tráfico constitutivo de GLT1, endocitosis y reciclaje a membrana, es dependiente de un ciclo de ubiquitinación-desubiquitinación del transportador. En efecto, la endocitosis de GLT1, tanto en sistemas de expresión heterólogos como en cultivos primarios de astrocitos, depende de la ubiquitinación en residuos de lisina de su extremo carboxilo, mientras que su reciclaje a membrana plasmática desde compartimentos endosomales tempranos es dependiente de la actividad de la desubiquitinasa UCHL 1.

P14-3

Soluble oligomers of amyloid- β peptide disrupt membrane trafficking of AMPA receptors contributing to early synapse dysfunction

Alfredo J. Miñano-Molina¹, Judit España¹, Elsa Martín¹, Bruna Barneda-Zahonero², Rut Fadó¹, Montse Solé², Ramon Trullàs³, Carlos A. Saura¹ y José Rodríguez-Álvarez¹

¹Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona. Centro de Investigación Biomédica en Red - Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Cerdanyola del Vallés, ²Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, ³Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC, Barcelona

β -amyloid ($A\beta$), a peptide generated from the amyloid precursor protein (APP), is widely believed to underlie the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Emerging evidences suggest that soluble $A\beta$ oligomers adversely affect synaptic function, leading to cognitive failure associated with AD. The $A\beta$ -induced synaptic dysfunction has been attributed to the synaptic removal of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors (AMPA). However, it is unclear how $A\beta$ induces the loss of AMPAR at the synapses. In this study we have examined the effect of $A\beta$ oligomers ($oA\beta$) on phosphorylation levels of GluA1 serine 845 (ser-845), a residue that plays an important role in the trafficking of AMPARs towards extrasynaptic sites and the subsequent delivery to synapses during synaptic plasticity events. We found that $oA\beta$ reduce basal levels of ser-845 phosphorylation and surface expression of AMPARs affecting AMPAR subunit composition. Dephosphorylation is related with an increase in calcium influx into neurons through ionotropic glutamate receptors that activate the calcium-dependent phosphatase calcineurin. We demonstrate that calcineurin mediates the reduction in phosphorylation levels of ser-845 GluA1 and subsequent reduction in surface expression of AMPARs. Moreover, $oA\beta$ block the extrasynaptic delivery of AMPARs induced by chemical synaptic potentiation. In addition, neurons from a genetic mouse model of Alzheimer disease expressed reduced amounts of AMPARs when accumulation of $oA\beta$ and spatial memory deficits start. These findings indicate that $oA\beta$ could act as a depressor affecting the mechanisms involved in the targeting of AMPARs to the synapses during early stages of the disease.

P14-4

Real-time measurement of an A2AR fluorescent agonist binding and D2R-mediated allosteric modulation

Victor Fernández Dueñas¹, Maricel Gómez-Soler¹, Dasiel O. Borroto-Escuela², T. Santhosh Kumar³, Jorge Gandía¹, Catarina Albergaria¹, Kjell Fuxe², Kenneth A. Jacobson³ y Francisco Ciruela¹

¹Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, ²Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), ³Molecular Recognition Section, Laboratory of Bioorganic Chemistry, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda (USA)

The molecular interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors (A2AR and D2R) when they are part of an oligomeric complex have been postulated to be relevant in the development and also the treatment of neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease. Here, by means of an A2AR fluorescent agonist (Alexa532-APEC) we examined the allosteric modulation of the D2R into the A2AR/D2R oligomer, and whether this receptor-receptor interaction was mostly mediated by two rich positive-charged regions in the intracellular loop 3 (IL-3) of the D2R. First, we cloned an A2AR construct tagged at the N-terminus with the cyan fluorescent protein (A2ARCFP(N)), which was preferentially expressed at the cell membrane and fully functional, as confirmed by determining agonist-induced cAMP changes. Furthermore, when transiently transfected cells were superfused with Alexa532-APEC it was elicited a FRET process, thus demonstrating a specific agonist-receptor interaction. Then, upon co-expression of A2ARCFP(N) and D2R, we challenged the effect of the D2R agonist quinpirole on Alexa532-APEC-induced binding. Interestingly, a significant lower FRET signal was obtained. However, these allosteric effects were abolished when mutating distinct arginine residues (217-222 and 267-269) in the IL-3 of the D2R. Thus, although A2AR/D2R oligomerization was mostly maintained, as verified by means of co-immunoprecipitation and confocal microscopy it was demonstrated that these positively-charged residues played a major role in mediating the observed allosteric receptor-receptor interaction. Overall, these results may provide further knowledge in order to better understand the role of the A2AR/D2R oligomer in diseases occurring in the central nervous system.

P14-5

Estudio de las interacciones diméricas entre receptores A2A de adenosina, mGlu5 de glutamato y D2 de dopamina en células SH-SY5Y

Sara Díaz Sanchez¹, Carlos Alberto Castillo Sarmiento¹, Isidre Ferrer Abizanda², Marta Barrachina Castillo³, Jose Luis Albasanz Herrero¹ y Mairena Martín López¹

¹Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Químicas. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, ²Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital-ICS, Bellvitge Biomedical Research Institute IDIBELL. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Barcelona. University of Barcelona-IDIBELL, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, L'Hospitalet de Llobregat, ³Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital-ICS, Bellvitge Biomedical Research Institute IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Barcelona

La dimerización de receptores se ha revelado en los últimos tiempos como un mecanismo de regulación de la actividad de los mismos. En el presente trabajo se ha analizado la existencia de dímeros de distintos receptores modulados en enfermedades neurodegenerativas como los A_{2A} de adenosina, los metabotrópicos de glutamato de tipo 5 (mGlu₅) y los D₂ de dopamina. Dicha modulación se ha observado también en la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano, tras someterlas a tratamientos de larga duración (24, 48 y 72 horas) con agentes metilantes (SAM, S-adenosil-metionina) y desmetilantes (Aza, 5'-Azacitidina) en presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo. En estas células se han realizado además ensayos de inmunoprecipitación y de ligación por proximidad (PLA, *Proximity Ligation Assay*) con dos aproximaciones experimentales diferentes según la casa comercial empleada (Duolink y Applied Biosystems). El conocimiento de los mecanismos de interacción y su alteración en distintas situaciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas, podría posibilitar en diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra dichas enfermedades.

P14-6

Efecto del resveratrol y del peróxido de hidrógeno sobre células C6 de glioma de rata

Mónica Condes Hervas, Jose Luis Albasanz Herrero y Mairena Martín López
Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Químicas. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

El tejido cerebral es muy sensible al daño oxidativo producido por las especies reactivas de Oxígeno (ROS), ello es posiblemente debido al elevado consumo de oxígeno existente en este tejido, y la consiguiente formación de ROS, durante el proceso de fosforilación oxidativa. Así, se han hecho estudios del efecto oxidativo de la exposición a peróxido de hidrógeno sobre la línea celular C6 de glioma de rata con características astrocíticas. Las células C6 es uno de los modelos celulares más relevantes para el estudio de gliomas, ya que éstos constituyen uno de los principales tumores cerebrales malignos en humano. Trabajos anteriores demuestran que el resveratrol, un estilbeno producido de forma natural, tiene efectos pleiotrópicos beneficiosos para estas células, como son actividad antitumoral y neuroprotectora. Por ello, se han realizado estudios del comportamiento de estas células ante tratamientos oxidantes como el peróxido de hidrógeno y también ante el tratamiento con resveratrol. Analizamos el efecto de estos tratamientos sobre la expresión de receptores de adenosina y metabotrópicos de glutamato, sobre la viabilidad celular con el ensayo del MTT, además realizamos un seguimiento en microscopio del comportamiento de las células C6 tras la exposición a peróxido y a resveratrol, para ver la vulnerabilidad de estas células ante el estrés oxidativo y el posible efecto "reparador" del resveratrol. Realizamos un seguimiento exhaustivo de la cinética de degradación del peróxido y vemos el efecto que tienen algunos de los componentes del medio de cultivo usado sobre éste, lo cual es esencial para cerciorarnos de las concentraciones de los tratamientos que hacemos en cada momento sobre las células C6 y ver el efecto real que el resveratrol tiene frente a este agente tóxico.

P14-7

New propargylamine- and donepezil-derived compounds as multitarget agents for the treatment of Alzheimer's disease

Irene Bolea¹, Alejandro Gella², Abdelouhaid Samadi³, Cristobal de los Rios³, José Luis Marco³ y Mercedes Unzeta¹

¹*Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. Barcelona,* ²*Universitat Internacional de Catalunya, San Cugat del Vallés,* ³*Laboratorio de Radicales Libres y Química Computacional (IOG,CSIC), Madrid*

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative disorder which etiology is not yet fully understood. The cholinergic theory suggests a selective loss of cholinergic neurons, besides alterations in serotonergic and dopaminergic transmission. In this context, the most innovative paradigm to combat neurodegenerative diseases, the multi-target directed-ligand (MTDL) approach, a new family of multi-target molecules able to interact with (AChE) and (BuChE), as well as with both MAO isoforms have been synthesized and pharmacologically assessed. The target molecules have been designed using a conjunctive approach that combines the benzylpiperidine moiety of the AChE inhibitor donepezil, and the indolyl propargylamino moiety of PF9601N, previously described by our group as a potent and selective MAO B inhibitor with neuroprotective properties. Among them, the most promising hybrid, **ASS234**, is a potent, irreversible, inhibitor of both MAO-A ($IC_{50} = 5.2 \pm 1.1$ nM) and MAO-B ($IC_{50} = 43 \pm 8$ nM), and a moderately potent mixed-type inhibitor of AChE ($IC_{50} = 0.35 \pm 0.01$ mM) and BuChE ($IC_{50} = 0.46 \pm 0.06$ mM). **ASS234** is also able to prevent the Ab_{1-40} and Ab_{1-42} self-aggregation in a 9.1 ± 2.4 % and 47.8 ± 2.1 %, respectively, as well as the AChE-dependent aggregation of Ab_{40} and Ab_{42} in a 32.4 ± 7.0 % and 39.6 ± 13.0 %. Finally, the potential neuroprotective properties of **ASS234** were assessed in PC12 and SH-SY5Y cells, by studying the effects of the hybrid compound against different insults involved in AD pathogenesis such as inflammation, oxidative stress and Abtoxicity. Overall, these results suggest that the new molecules are promising multi-target anti-Alzheimer drugs and potential candidates to delay the cognitive decline underlying this neurodegenerative disorder.

P14-8

Structural analysis of neurokinin A by circular dichroism and small angle X-ray scattering

Arash Foroutan¹, Tzvetana Lazarova¹, Francesc Sepulcre² y Esteve Padrós¹

¹*Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica, Biologia Molecular i Centre d'Estudis en Biofísica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,*

²*Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya, Castelldefels*

Neurokinin A (NKA), belongs to the Tachykinin family of neuropeptides and is an agonist of Neurokinin 1 G-protein coupled receptor. It is involved in wide biological processes including regulation of pain transmission, activation of immune system and asthma. To understand the molecular mechanism of ligand-receptor interactions, we studied NKA structure using circular dichroism (CD) and small angle X-ray scattering (SAXS). CD data show mainly two distinct conformations (extended and α -helical structure), which strongly depends on peptide environment. SAXS data in aqueous solution give an average radius of gyration (R_g) around 0.71 nm. To investigate the effect of temperature on the overall dimensions of NKA in solution, we carried out SAXS measurements at different temperatures. The Kratky plots shift to a higher momentum transfer, as the temperature increases, suggesting for a structural changes of NKA. Moreover, the distance distribution function, $P(r)$, reveals a two-domain geometric shape. We also present Ab initio prediction of the NKA shape from SAXS data.

P14-9

Role of SIRT1 in the cellular resistance to stress

Rafael Balada¹, Nuria de Vera¹, Tomas Santalucia¹, Alejandro Vaquero², Anna M. Planas¹ y Valérie Petegnief¹

¹*Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC, IDIBAPS), Barcelona,*

²*IDIBELL, Hospitalet de Llobregat*

SIRT1, the mammalian homolog of the yeast Silent Information Regulator (Sir2p), is involved in important biological functions such as the control of transcriptional activity, response to oxidative stress, inhibition of apoptosis, and mitochondrial activity amongst others. However, depending on the energetic resources of the cell or the environment, SIRT1 contributes to cell survival or accelerates cell death. Our main objective was to elucidate the putative contribution of SIRT1 to neuronal fate after ischemia since the conclusions of the few studies published so far are controversial. To answer this question, we used primary neuron cultures challenged with ischemic stimuli. Excitotoxicity was shown to induce ER stress. As an approach in a cell line, we treated wt or SIRT1 ko mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with the ER-stress inducer tunicamycin, and analyzed changes in SIRT1 and stress proteins. Primary neuron cultures were challenged with excitotoxicity. MEFs were treated with a lethal concentration of tunicamycin. The analysis of SIRT1, ER stress markers and chaperones was performed by western blot and immunocytochemistry. In neurons, excitotoxicity induced an early loss of SIRT1 in the cytoplasm, that

preceded neuronal death. SIRT1 ko MEFs were more resistant to ER stress than wt MEFs and displayed higher expression and altered grp78 subcellular localization. Our data suggest that the absence of SIRT1 may be beneficial in stress conditions since it may prompt the cell to undertake reprogramming of the expression of selective chaperones and help it to confront conditions leading to apoptosis. Nevertheless, we still need to determine whether Sirt1 deficiency in neurons fulfills the same function.

Note: Supported by a grant from the ISCIII (FIS, PI081932).

P14-10

Finasteride and Allo-pregnenolone administration on the anxiolytic: Effect of music in female rats

Juan Ismael Quero, Isaac Túnez Fiñana, Pedro Montilla López y Inmaculada Tasset Cuevas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Córdoba

Introduction: Previous studies in rodents show that ovarian hormones, especially progesterone (PG), are involved, in the anxiolytic effect of music. Mainly, this research assessed the influence of PG derivatives.

Material and methods: For this purpose two experiments were designed: 1) Allo-pregnenolone (alloP) administration to ovariectomized rats and 2) administration of finasteride, 5 α reductase inhibitor, to intact female rats. Both models are subjected to silence, noise and music (Mozart Sonata K448).

Anxiety was evaluated by elevated plus maze (EPM) for 5 minutes, estimating time spent in open arm (TOA) and total number entries (TNE). Experiment 1 was conducted during 14 day after ovariectomy, being alloP injected 2 hours before measuring TOA and TNE. Similarly, 2 hours before of assay, finasteride was injected.

Results: Ovariectomy significantly decreased TOA and TNE in silence and in lesser degree after music. Finasteride prompted a significant decreases in three experimental conditions ($p < 0.001$).

Conclusion: The data suggest that PG, mainly alloP, play an important role in anxiolytic effect of music. This effect may be due, at least, to ambient created by music in presence of PG derivatives. In the other hand, it is well demonstrated the interactions between these compounds and GABA-receptors, and their anxiolytic action.

P14-11

The Parkinson's disease-associated GPR37 receptor signalling is controlled by its intracellular cytoskeleton domain

Jorge Gandía Sánchez¹, Víctor Fernández Dueñas¹, Igor Staglar², Leonardo Pardo Carrasco³, Rosario González Muñoz⁴ y Francisco Ciruela Alférez¹

¹Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, ²Department of Biochemistry and Department of Molecular Genetics, Terrence Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto, Toronto (Canada), ³Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ⁴Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid

GPR37, also known as Pael-R (parkin associated endothelin-like receptor), is an orphan GPCR that aggregates intracellularly in a juvenile form of Parkinson's disease. However, little functional and structural information is known about this receptor. Here, we focus on the C-terminal tail of GPR37 and we aim our interest to the cysteine residues that are found in it. Thus, we have generated several mutants by different deletions of the intracellular tail of this receptor and analyzed its surface expression. Interestingly, one of the mutants that only lacks a group of six cysteine residues (GPR37 Δ ⁵⁶³⁻⁸) has an enhanced presence on the plasma membrane compared to the native form of GPR37. Furthermore, when cultured cells expressing either GPR37^{WT} or GPR37 Δ ⁵⁶³⁻⁸ were grown in oxidant conditions, only the wild type form was affected and its surface expression was reduced, along with its signalling capacity. Overall, the results allow us to characterize a new region on the C-terminal tail of the orphan receptor GPR37 that is important for its function and contributes to understand better a rather unknown member of the GPCR family.

Note: This work was supported by grants SAF2008-01462 and Consolider-Ingenio CSD2008-00005 from Ministerio de Ciencia e Innovación and ICREA Academia-2010 from the Catalan Institution for Research and Advanced Studies.

P14r-12

¿Está la recombinación somática involucrada en la formación de la memoria?

Irene Suárez Pereira¹, Yaiza del Pozo Martín¹, Antonio J. Pérez Pulido² y Ángel M. Carrión Rodríguez¹

¹Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla,

²Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla

Los modelos actuales que explican la memoria duradera se basan en la suposición de que las huellas de la memoria se almacenan mediante modificaciones estructurales de las conexiones sinápticas, los cuales dan lugar a alteraciones en los patrones de actividad neuronal. Los cambios en la expresión de genes se consideran esenciales para estas modificaciones estructurales. Estudios recientes sugieren que la memoria permanente podría estar codificada a nivel genómico por mecanismos de recombinación somática. Por lo tanto, las huellas de la memoria permanente podrían estar presentes dentro de las neuronas en forma de nuevas proteínas codificadas por los genes modificados. El proceso de recombinación somática implica la actividad de endonucleasas, polimerasas y ligasas, entre otras enzimas. El análisis de la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la recombinación somática demostró que dichos genes se expresan en áreas cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, la actividad ligasa, fundamental para el proceso de recombinación, aumenta después de una sesión de entrenamiento con un curso temporal consistente con la función del hipocampo en el almacenamiento de la información aprendida. Estos datos sugieren que la maquinaria metabólica de ADN puede estar activa durante la formación de la memoria. Además, a nivel conductual, la administración sistémica o local de ara-C, un inhibidor de la ADN ligasas y polimerasas, en diferentes momentos alrededor de una sesión de aprendizaje provocó deficiencias en memorias duraderas sin provocar alteraciones en el proceso de adquisición de información. Todos estos datos sugieren que la recombinación somática podría ser un proceso necesario para el establecimiento de memorias duraderas.

P15. Parasitología Molecular

P15-1

Topotecan e Irinotecan son fármacos leishmanicidas por estabilización de los complejos topoisomerasa-DNA

Christopher Fernández Prada, Celia Fernández Rubio, Estefanía Calvo Álvarez, Yolanda Pérez Pertejo, Raquel Álvarez Velilla, Rafael Balaña Fouce y Rosa Reguera Torres

Universidad de León, León

Las topoisomerasas de tipo IB (TopIB) de *Leishmania* son proteínas heterodiméricas (característica solamente compartida con sus ortólogas de tripanosomas) por lo que son consideradas como potenciales dianas terapéuticas frente a las leishmaniosis. La camptotecina (CPT) es un veneno de las TopIB que estabiliza los complejos enzima-DNA, retrasando e impidiendo el paso de religación característico de estas enzimas. Hemos estudiado el efecto de la CPT y dos análogos hidrosolubles que se utilizan en la terapia del cáncer: el topotecan (Hycantim[®]) y el irinotecán (Camptosar[®]) un pro-fármaco que se metaboliza a SN38, en promastigotes de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. major*, comparando su eficacia con la de la miltefosina. Se ha estudiado la formación in situ de complejos DNA-proteína precipitables en SDS/K en promastigotes de *Leishmania* demostrando el carácter de venenos de Top de estos fármacos. La potencia como venenos de TopIB se evaluó comparativamente in vitro entre los enzimas humanos y de *Leishmania*, mostrando que la potencia para inhibir la relajación del DNA superenrollado fue mucho mayor con el enzima del parásito que con la humana. Sin embargo, el tiempo de estabilización de los complejos enzima-DNA con estos compuestos fue muy corto. Los ensayos de equilibrio escisión/religación realizados con la TopIB de *Leishmania* demostraron que la CPT y sus dos análogos desplazaban el equilibrio de la reacción hacia el proceso de escisión a las mismas concentraciones que con el enzima humano, aunque se observó un sitio de corte adicional preferente. En conclusión, los análogos de CPT tuvieron un fuerte efecto leishmanicida en promastigotes, pero debe estudiarse la forma de mejorar su seguridad en el hospedador.

Nota: MICINN AGL2010-16078/GAN; ISCIII PI09/0448 y RICET; JCyL Gr238.

P15r-2

Un nuevo transportador ABC de *Leishmania* está implicado en la resistencia a antimoniales y otros metales pesados

José Ignacio Manzano¹, Raquel García-Hernández¹, Yovana Sanchis², Santiago Castany¹ y Francisco Gamarro¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada, ²G.V. Conselleria Sanitat Laboratori S.P. Metales, Valencia

La quimioterapia es actualmente la única herramienta de lucha eficaz frente a la leishmaniasis, aunque el reducido arsenal de fármacos disponibles y el incremento significativo del fallo terapéutico/resistencia limitan el control de esta enfermedad parasitaria. La búsqueda de marcadores de resistencia es importante para la aplicación de estrategias terapéuticas alternativas más eficaces. La familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) en *Leishmania* incluye 42 genes distribuidos en 8 subfamilias (A-H), algunos de los cuales tienen funciones biológicas relevantes. Existe un grupo de 4 transportadores (ABCU, ABCX, ABCY y ABCZ) sin clasificar y de función desconocida, que son únicos y específicos de tripanosomátidos. El transportador ABCX (LmjF 33.3260) es un half-transporter que se expresa en formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania*. Hemos obtenido parásitos que sobreexpresan el transportador ABCX solo o fusionado a GFP, y un mutante inactivo K742M. Hemos comprobado que la sobreexpresión de ABCX confiere una resistencia significativa a Pentostam, compuesto de Sb(V) de uso clínico frente a la leishmaniasis, y a Sb(III), la forma reducida activa frente al parásito, así como a los iones metálicos, As(III) y Cd(II), debido a una reducción en su acumulación por incremento de su eflujo. Igualmente, comprobamos que la resistencia a metales revierte tras la reducción de los niveles de tioles mediante el pretratamiento con butionina-sulfoximida. Los estudios de localización subcelular en parásitos que sobreexpresan ABCX-GFP, sugieren que el transportador se localiza principalmente en la mitocondria del parásito, lo que le implicaría en funciones biológicas relevantes para el parásito.

Nota: Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto SAF2009-07440 (F.G).

P15-3

Demostración de intercambio genético durante la coinfección de dos cepas de *Leishmania* spp. en el vector *Phlebotomus perniciosus*

Estefanía Calvo Álvarez¹, María Isabel Jiménez Alonso², Ricardo Molina Moreno², Christopher Fernández Prada¹, Raquel Álvarez Velilla¹, Yolanda Pérez Pertejo¹, Rosa María Reguera Torres¹, José María Requena³ y Rafael Balaña Fouce¹

¹Universidad de León, León, ²Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, ³Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Los protozoos del género *Leishmania* son parásitos intracelulares transmitidos a través de dípteros de la subfamilia *phlebotominae* y son los responsables de un amplio espectro de enfermedades que afectan a la piel, las membranas mucosas y los órganos internos. En este estudio se demuestra la existencia de intercambio genético entre dos cepas transgénicas de *Leishmania* spp. portadoras de distintos marcadores fluorescentes (mCherry y Citrine) y diferentes cassettes de resistencia antibiótica (mCherry-BSD, Citrine-HYG), durante la fase ocurrida en el vector flebotomino. Se realizaron infecciones con hembras de *Phlebotomus perniciosus* de 3 a 7 días de edad, las cuales fueron alimentadas con los promastigotes mCherry y Citrine a una concentración variable de 1-2x10⁷ parásitos/ml; a los 6-11 días post-alimentación se realizaron las disecciones del tubo digestivo de las hembras de flebotomo. La presencia de ambos marcadores fluorescentes y genes de resistencia antibiótica fue confirmada mediante amplificación por PCR desde el DNA genómico de los promastigotes híbridos. El intercambio genético ha contribuido y contribuye a la amplia diversidad fenotípica en las poblaciones naturales, por lo que el análisis de la progenie híbrida aparece como una herramienta poderosa para el estudio de genes que controlan caracteres tales como la virulencia, el tropismo tisular o la resistencia antibiótica.

P15r-4

Caracterización funcional de la tirosina aminotransferasa en el catabolismo de aminoácidos aromáticos en *Leishmania infantum*

M. A. Moreno, A. Alonso, P. J. Alcolea, A. Fernández y V. Larraga

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid

Leishmania infantum es un protozoo parásito de la familia de los tripanosomátidos que infecta a humanos y al perro, el reservorio en la cuenca mediterránea. Previamente ha sido detectado un mayor nivel de transcrito de tirosina aminotransferasa (TAT) en promastigotes metacíclicos PNA- mediante *microarrays* de DNA desarrollados en nuestro laboratorio. Por otro lado, se ha demostrado la secreción del ácido p-hidroxifenil-láctico (el producto final de la transaminación de la tirosina) en el sobrenadante de cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, pero no así en el caso de promastigotes de *L. mexicana*. El presente trabajo corrobora la secreción de este producto en cultivo de promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum*, así como la expresión, purificación y caracterización funcional de la TAT de dicha especie. La localización subcelular de esta proteína es citoplasmática formando agregados, de acuerdo con los ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Este enzima muestra una amplia especificidad de sustrato con preferencia por el piruvato y por el α -cetometiltiobutirato. Este último es el sustrato del último paso de la regeneración de la metionina, una ruta esencial para la supervivencia del parásito. Sin embargo, esta aminotransferasa reacciona con baja actividad específica con el α -cetoglutarato, lo que indica que, probablemente, no tiene actividad alanina aminotransferasa. La TAT de *L. infantum* fue modelada utilizando como modelo la TAT de *T. cruzi*. Teniendo en cuenta tanto la disposición de los residuos que forman parte del centro activo en el modelo como los resultados de los ensayos de actividad de la proteína, se puede llegar a la conclusión de que, a pesar de tener una alta similitud de secuencia la TAT de *L. infantum* con la TAT de *T. cruzi*, sus funciones en el metabolismo del parásito son distintas.

P15r-5

A novel TOR regulates development of proliferative to quiescent bloodstream forms in *Trypanosoma brucei*

Antonio Barquilla¹, Manuel Saldivia¹, Rosario Diaz¹, Jean-Mathieu Bart¹, Isabel Vidal¹, Enrique Calvo², Michael N. Hall³ y Miguel Navarro¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada, ²Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, ³Biozentrum, University of Basel, (Switzerland)

African *trypanosomes* are protozoan parasites transmitted by a tsetse fly vector to a mammalian host. The life cycle includes highly proliferative forms and quiescent forms, the latter being adapted to host transmission. The

signalling pathways controlling the developmental switch between the two forms remain unknown. Like other eukaryotes, *Trypanosoma brucei* contains two Target of Rapamycin (TOR) kinases, TbTOR1 and TbTOR2, in two functionally and structurally distinct complexes termed TbTORC1 and TbTORC2 (Barquilla *et al* 2008). Surprisingly, two additional TOR kinases are encoded in the *T. brucei* genome. Here we show that TbTOR4 protein is expressed and forms a novel multiprotein complex (TbTORC4), which is functionally, and biochemically distinct from TbTORC1 and TbTORC2. TbTOR4 expression is downregulated in response to the secondary messenger cAMP, whose production is triggered upon high parasitemia to induce quiescence. Furthermore, depletion of TbTOR4 causes an irreversibly quiescent form of the parasite. Our results reveal unexpected complexity in TOR signaling and show that TbTOR4 negatively regulates differentiation of the proliferative form into the quiescent form.

P15r-6

La tafenoquina, un fármaco oral en uso frente a la malaria, es activa in vitro e in vivo frente a *Trypanosoma brucei* al inhibir la glucólisis del parásito

Marta Martínez-García¹, Ignacio Pérez-Victoria², Suyapa Amador¹, Elena González-Rey¹, Mario Delgado¹, Santiago Catans¹, Francisco Gamarro¹, Vanessa Yardley³ y Jose M^a Pérez-Victoria¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada, ²Fundación MEDINA, Granada, ³Faculty of Infectious and Tropical Disease, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London (UK)

Cuando el protozoo parásito *Trypanosoma brucei* llega al sistema nervioso central produce la fase neurológica de la enfermedad del sueño, mortal en ausencia de tratamiento. Los pocos medicamentos disponibles son muy tóxicos y difíciles de administrar, por lo que se necesitan nuevos fármacos capaces de cruzar la barrera hematoencefálica sin producir neurotoxicidad, de administración oral y a un precio asumible por los pacientes. La reposición de fármacos (utilización de medicamentos en uso para tratar otras enfermedades) es una estrategia interesante para identificar este tipo de compuestos. La tafenoquina (TFQ) es un fármaco oral que cumple estos requisitos. Está en fase clínica avanzada (IIb/III) para tratar y prevenir la malaria y ha demostrado ser eficaz frente a *Leishmania*. En este trabajo mostramos que la TFQ es activa a concentraciones

submicromolares frente a distintas subespecies de *T. brucei*, incluyendo *T. b. rhodesiense*, produciendo alteraciones celulares a nivel del bolsillo flagelar, el núcleo y la mitocondria. En *Leishmania*, la TFQ inhibe el citocromo C reductasa, pero esta proteína no se expresa en el estadio sanguíneo de *T. brucei*. Distintas evidencias sugieren que la glicólisis, la única fuente de ATP del parásito, es la diana de este fármaco en *T. brucei*: La TFQ provoca una rápida caída del ATP celular e inhibe la producción de piruvato, el producto final del metabolismo de la glucosa. Estudios de metabolómica en curso permitirán elucidar la diana concreta dentro de la vía glucolítica. Finalmente, experimentos preliminares muestran que la TFQ oral es efectiva en un modelo murino de infección aguda, produciendo el mismo efecto que el fármaco control pentamidina.

Nota: Financiación: MSC-FIS PI081902 (JMPV) y Fondos FEDER de la UE (JMPV).

P15r-7

Caracterización del mecanismo de entrada y tráfico intracelular de hemo en *Leishmania*

María Cabello-Donayre, Jenny Campos-Salinas, Marta Martínez-García, Raquel García-Hernández, Ignacio Pérez-Victoria, Santiago Castanys, Francisco Gamarro y José María Pérez-Victoria
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada

El protozoo parásito *Leishmania* es responsable de la leishmaniasis, una devastadora enfermedad tropical considerada como emergente y olvidada por la OMS. Una estrategia atractiva para la identificación de nuevas dianas farmacológicas consiste en aprovechar diferencias bioquímicas entre estos organismos y el hospedador humano. El metabolismo del grupo hemo, un metabolito esencial en todos los organismos aeróbicos, constituye una de estas diferencias, ya que como el resto de tripanosomatidos patógenos, *Leishmania* es auxótrofo para esta porfirina y debe tomarla del hospedador humano. *Leishmania* puede tomar el hemo unido a la hemoglobina endocitada a través de un receptor ya identificado, o bien utilizar hemo libre a través de un mecanismo desconocido. Mediante el uso de análogos fluorescentes del hemo y de la hemoglobina, hemos demostrado que ambos compuestos siguen rutas de entrada diferentes y que la internalización de hemo libre se produce a través de un transportador específico que estamos tratando de identificar. A su vez, hemos demostrado que el rescate del hemo proveniente de la hemoglobina endocitada requiere el concurso de un transportador ABC, LABC5, exclusivo de

tripanosomátidos. La disminución de la función de LABC5 impide el crecimiento normal del parásito salvo que se añada hemo al medio de cultivo. Este fenotipo se debe a que LABC5, que se localiza en cuerpos multivesiculares, es necesario para que el hemo unido a la hemoglobina llegue a la mitocondria, no afectando al tráfico de hemo libre. Finalmente, la entrada de hemo en la mitocondria, su destino principal, podría ser mediada por transportadores ABCB, como se ha sugerido en células de mamífero y en levaduras.

Nota: MSC-FIS PI081902 (JMPV) y Fondos FEDER de la UE (JMPV).

P15-8

Péptidos penetradores en *Leishmania* derivados de la crotamina

María Fernández-Reyes¹, M^a Ángeles Abegózar¹, Beatriz G. De la Torre², Juan Román Luque-Ortega¹, Gandhi Radis-Baptista², David Andreu² y Luis I. Rivas¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ²DCEXS-Universidad Pompeu Fabra-PRBB, Barcelona

La definición de dominios de toxinas implicados en interacción con membranas es útil en el desarrollo de péptidos antimicrobianos y penetradores celulares (CPPs) con relevancia terapéutica. La disección molecular de la crotamina, una toxina de serpiente de 42 aa con actividad CPP (*Kerkis* 2004, *FASEB J* 18; 1407), permitió definir NrTP1 (YKQCHKKGGKGGG), un híbrido de los segmentos (1-9) y (38-42), como secuencia mínima con actividad CPP y localización nucleolar preferente en células HeLa. En este trabajo se estudian las actividades CPP y antimicrobiana de NrTP1 y sus análogos NrTP6 (C4S), NrTP7 (pansustitución de K por R) y NrTP8 (Y1W, C4S) en el protozoo *Leishmania*. Para dichos péptidos se ha evaluado: i) Toxicidad sobre ambas formas del parásito y en macrófagos murinos (MF) infectados o no; ii) Permeabilización de membrana plasmática, y iii) Localización y acumulación intracelular. Se concluye que: i) Ninguno de los 4 péptidos ($\leq 40 \mu\text{M}$) es tóxico, ni sobre formas axénicas ni sobre MFs; ii) NrTP7 y NrTP8 son sólo activos en promastigotes; iii) La actividad CPP es superior en amastigotes axénicos que en promastigotes; iv) Todos los péptidos penetran en MFs; v) NrTP7 y NrTP8 se acumulan en la vacuola parasitófora, mientras que TP6 lo hace en amastigotes intracelulares. Los resultados ilustran la modulación de la actividad CPP de NrTP1 por residuos clave y su efecto sobre la funcionalidad.

Nota: Subvenciones: UE (HEALTH-2007-223414), FIS (PS09-01928 y RETICs RD 06/0021/0006), Generalitat de Catalunya (SGR2009_492).

P15-9

Actividad leishmanicida de péptidos derivados de lactoferrina

M^a Ángeles Abengózar¹, Tânia Silva², María Fernández-Reyes¹, David Andreu³, Kamran Nazmi², Jan G. Bolscher⁴, Margarida Bastos² y Luis Rivas¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ²Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, (Portugal), ³Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, ⁴ACTA, Department of Oral Biochemistry, Amsterdam (Netherlands)

Los péptidos antimicrobianos (PA) híbridos optimizan su actividad por combinación de secuencias de dos PAs diferentes. Otra estrategia es la combinación de secuencias de la misma proteína no contiguas secuencialmente, pero sí en 3D simulando la disposición espacial de la proteína original, con minimalización de la estructura activa de la misma, con menor coste inmunogenicidad y optimización farmacológica. Dos PA han sido definidos de la lactoferrina bovina, lactoferricina (LFcin 17-30) por hidrólisis péptica, y lactoferrampin (LFampin 265-284). El péptido híbrido LFChimera (17-30)-K-(265-284) simula la disposición espacial de los 2 PA anteriores en lactoferrina. Se ha caracterizado: i) La actividad leishmanicida de LFcin, LFampin y LFChimera ($EC_{50} = 3.7, 21.4, 28.4 \mu M$ en promastigotes de *Leishmania donovani*. ii) Su actividad permeabilizante sobre la membrana plasmática del parásito por una variedad de técnicas de microscopía de fluorescencia y electrónica y análisis funcionales (entrada de sonda vital, despolarización de membrana plasmática y pérdida de ATP intracelular); en todos los casos su dependencia con la concentración es paralelo a su efecto leishmanicida. Los resultados demuestran que la combinación de fragmentos no contiguos en la secuencia primaria pero sí topológicamente, simula e incluso mejora la actividad microbicida de la proteína inicial, incrementando la utilización farmacológica de estructuras naturales de alta complejidad.

Nota: Subvencionado por UE (HEALTH -2007-223414) y FIS (PS09-01928 y RETICs RD 06/0021/0006) y acción concertada España-Portugal nº E-40/90.

P15-10

DNA polimerasa theta de *Leishmania infantum*: Localización y actividad

Abel Fernandez Orgiler¹, Ana Alonso¹, María Isabel Martínez-Jimenez², Miguel Angel Moreno¹, Pedro José Alcolea¹, Luís Blanco² y Vicente Larraga¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ²Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Leishmania infantum es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral en la cuenca mediterránea, y el perro su principal reservorio. El ciclo biológico de *Leishmania* es dimórfico y digenético diferenciándose un estadio promastigote en el insecto vector y un estadio amastigote en el hospedador mamífero. La DNA polimerasa theta (pol Θ) es una polimerasa perteneciente a la familia A, que en el ser humano participa en la tolerancia al daño mediante incorporación de un nucleótido opuesto a timina-glicol o a un sitio abásico, y en la elongación de la cadena polinucleotídica a partir de la base opuesta a la lesión (Seki 2004). Mediante la expresión de la pol Θ de *L.infantum* (LiPol Θ) en *E.coli* se generó dos anticuerpos policlonales, que resultaron positivos cuando se testaron frente a bacterias no inducidas e inducidas para comprobar su especificidad. En *Leishmania* cada uno de los anticuerpos reconoce una forma de la proteína diferente (115 y 130kDa). Ambas formas de la proteína se expresan en niveles similares a lo largo del ciclo de diferenciación de los promastigotes, si bien su localización difiere: La forma de 115kDa se encuentra en el kinetoplasto y la de 130kDa en el núcleo. Ensayos de actividad realizados con la forma proteica completa (130kDa) expresada en extractos de reticulocitos de conejo, muestran una actividad máxima a 37°C en presencia de Mg²⁺. LiPol Θ al igual que la humana presenta dificultad en la polimerización tras incorporación de dGTP. Sin embargo, LiPol Θ no es capaz de superar sitios abásicos, por lo que su papel podría ser diferente. En este sentido, la capacidad para realizar la correcta incorporación frente a 8oxoG podría indicar una posible función relacionada con la tolerancia o reparación frente a daño oxidativo.

P15-11

Caracterización bioquímica y determinación del perfil de inhibición de la péptido desformilasa-1 de *Trypanosoma cruzi*

C. Rodrigues-Poveda¹, G. Pérez-Moreno¹, A. E. Vidal¹, D. González-Pacanowska¹, J. A. Urbina² y L. M. Ruiz-Pérez¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Granada, ²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Bioquímica y Biofísica, Caracas (Venezuela)

La síntesis de proteínas comienza de manera sistemática con metionina como primer aminoácido. En orgánulos y eubacterias esta metionina experimenta la incorporación de un grupo formilo que debe ser retirado de la proteína naciente para que tengan lugar las modificaciones post-traduccionales que determinarán su madurez biológica. La escisión del grupo N-formilo es catalizada por la péptido desformilasa (PDF), un enzima perteneciente a la subfamilia de metaloproteasas y constituye un proceso esencial en todas las bacterias estudiadas hasta la fecha. Este enzima está presente en plantas, humanos y en protozoarios de importancia biomédica como *Plasmodium* y tripanosomátidos. El parásito *Trypanosoma cruzi*, responsable de la enfermedad de Chagas, contiene dos proteínas que presentan homología con PDFs denominadas PDF-1 y PDF-2. En este trabajo hemos obtenido una versión truncada en el extremo N-terminal de PDF-1 que es activa frente al sustrato formilado f-MAS con valores de parámetros cinéticos similares a las de otras PDFs eucariotas pero con diferencias importantes con respecto a los requerimientos de cofactor metálico y el perfil de inhibición. Así, la adición de agentes quelantes de iones divalentes y el incremento de la fuerza iónica modulan significativamente la actividad que es dependiente de la naturaleza del cofactor metálico siendo máxima en presencia de Cu²⁺. En contraste con los enzimas humanos y de *Escherichia coli*, la PDF-1 de *T. cruzi* es insensible a actinonina y activada por la 1,10-fenantrolina. Estas propiedades, junto con la demostración de que las PDFs son esenciales en formas en cultivo de *Trypanosoma brucei*, permiten postular que las desformilasas de tripanosomátidos son un blanco bioquímico de interés para el diseño de inhibidores selectivos.

P15-12

Clonaje, expresión y purificación de los fragmentos proteicos L25a, HSP70a y del fragmento quimérico L25a-70a de *Leishmania braziliensis* en la levadura *Pichia pastoris*

María Ynigo Rivera, Ana Cristina González García y Basilio Valladares Hernández

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC), La Laguna, Canarias

Los fragmentos proteicos L25a y HSP70a (de los extremos amino terminales de la proteína ribosomal L25 y de la proteína de choque térmico HSP70, respectivamente) de *Leishmania braziliensis*, expresados en *E. coli*, han sido capaces de estimular la proliferación de linfocitos y la producción de óxido nítrico en macrófagos de ratones BALB/c infectados previamente inmunizados. Dado que dichos fragmentos fueron expresados en un sistema procariota, no poseen las modificaciones post-traduccionales típicas de eucariotas, que potencialmente podrían influir en su capacidad antigénica. Por otro lado, las proteínas recombinantes obtenidas a partir de dichos sistemas pueden contener trazas de LPS, molécula capaz de generar falsos positivos en ensayos de respuesta celular. Con el objeto de solventar estos problemas y obtener proteínas que se asemejen más a las producidas por *Leishmania*, los fragmentos de DNA que codifican para las proteínas L25a, HSP70a y L25a-70a, fueron clonados en el vector de expresión pPICZαA. Los productos de dichos clonajes fueron usados para transformar dos cepas de la levadura *Pichia pastoris*. Tras seleccionar los clones que producían mayor cantidad de proteína, se optimizaron, para cada uno de los casos, las condiciones de expresión y purificación por cromatografía de afinidad a níquel. En el caso de los fragmentos HSP70a y L25a-70a, que poseen sitios de glicosilación, la proteína purificada fue deglicosilada para comprobar que su tamaño coincidía con el tamaño esperado. La capacidad inmunogénica de las proteínas L25a, HSP70a y L25a-70a, obtenidas utilizando *P. pastoris* como sistema de expresión, será evaluada en estudios posteriores.

P16. Radicales Libres y Estrés Oxidativo

P16-1

Marcadores de estrés oxidativo en el cambio de alojamiento de cerdas reproductoras

Raquel Peña Román¹, Yolanda Saco Rodríguez¹,
Raquel Pato González¹, Anna Marco-Ramell¹,
Lorenzo Fraile² y Anna Bassols¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Departament de Producció Animal. Universitat de Lleida, Lleida

El sistema actual de producción de lechones incluye la llegada de las hembras jóvenes a la granja, donde son instaladas en corrales durante el periodo de cuarentena, y posteriormente son trasladadas a la sala de cubrición. Esto supone un estrés para los animales, que se encuentran en jaulas individuales con espacio reducido para moverse. Con el objetivo de identificar marcadores del grado de estrés, se obtuvieron muestras de sangre en la nave de cuarentena (día 1) y después del traslado a la nave de cubrición (días 3, 4 y 5) en dos grupos de animales ("control" y "estudio", n=15). Nuestros resultados mostraron que los niveles de ácidos grasos libres (NEFAs) aumentaron el día 3 debido a la disminución de ingesta pero luego se normalizaron en ambos grupos. Triglicéridos y colesterol aumentaron debido al cambio de dieta. Los niveles de CK y ALT incrementaron el día 3 en el grupo de estudio. La haptoglobina aumentó el día 3 y se normalizó posteriormente, mientras que la CRP siguió elevada en el grupo de estudio. El incremento de haptoglobina fue posiblemente debido al estrés que se produce en el animal, mientras que la CRP parece ser más sensible a la inflamación producida por la extracción repetida de muestras que al cambio de nave. La actividad del enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD), y de manera menos notable de la glutatión peroxidasa (GPx) y la concentración de glutatión total, incrementaron el día siguiente al cambio de nave. En el grupo control los valores se mantuvieron elevados a lo largo de los días siguientes, mientras que se produjo una disminución a partir del día 3 en el grupo de estudio. Estos resultados indican que se produce un incremento en el grado de estrés oxidativo en cerdas sometidas a cambios en el sistema de alojamiento.

P16-2

Influencia de los fotoperiodos en los niveles plasmáticos de leptina y el estrés oxidativo en la nefropatía por adriamicina

Antonia Díaz Moreno¹, Isaac Túnez², Fernando Rodríguez Cantalejo¹, Cristobal Aguilera Gámiz¹, Pedro Montilla López² y Inmaculada Tasset Cuevas³

¹Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba,

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Córdoba, ³Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Universidad de Córdoba, Córdoba

Estudios recientes han mostrado como los fotoperiodos pueden afectar a la secreción y liberación de péptidos biológicos como la leptina. En el presente trabajo, se estudia el comportamiento de leptina plasmática y del estrés oxidativo en riñón, bajo la influencia de diferentes fotoperiodos, en ratas machos tratadas con adriamicina. Tres tipos de fotoperiodos fueron aplicados durante cuatro semanas: Normal, N (14h luz/ 10h oscuridad); iluminación permanente, IP (24h luz); oscuridad permanente, OP (24h oscuridad). Se estiman: Lipoperóxidos en tejido renal. Proteinuria; urea y creatinina plasmáticas; además de los niveles plasmáticos de leptina y de melatonina. Contraste de hipótesis mediante test ANOVA. En los animales tratados con adriamicina se observa un incremento significativo de la lipoperoxidación renal y de los niveles de urea, creatinina y proteinuria, frente a los grupos no tratados ($p < 0,001$). Este estado de estrés oxidativo se agrava con la iluminación permanente ($p < 0,01$). Con la iluminación permanente se produce un acusado incremento de los valores de leptina ($p < 0,001$) y un descenso moderado en el grupo con oscuridad permanente ($p < 0,05$). Es evidente la gran correlación entre el grado de lipoperoxidación y los parámetros indicativos de nefropatía, similares a los descritos en humanos con glomerulosclerosis focal y el incremento de aquella con la luz permanente. El presente estudio sugiere que el fotoperiodo influye en las concentraciones de leptina. El importante descenso en las concentraciones de MEL endógena en estas condiciones experimentales sugiere el extraordinario efecto antioxidante de ésta.

P16-3

Efecto de la hipoxia sobre la velocidad de proliferación de diversas líneas de hepatoma

Maite Siles, Silvia Cepeda, Susana Meijide, Oihana López de Vergara, Rosaura Navarro, M. Begoña Ruiz-Larrea y José Ignacio Ruiz-Sanz
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa

Los tumores sólidos se forman y progresan en un ambiente de hipoxia, recurriendo las células a la glucólisis anaerobia para satisfacer sus requerimientos energéticos. La hipoxia conlleva un aumento de la formación de ROS. Los ROS pueden alterar el equilibrio redox celular, dando lugar a una situación de estrés oxidativo, que conlleva daño a macromoléculas y muerte celular. Por otra parte, ROS actúan como moléculas señalizadoras capaces de inducir la expresión de genes clave para la supervivencia celular. Hemos estudiado el efecto de la hipoxia sobre la proliferación celular de diversas líneas tumorales de hígado, tanto humanas (CHL, HepG2, HTB-52, HuH7 y PLC/PRF/5) como de rata (McA-RH7777). Las células a distintas densidades se sembraron en microplacas y se cultivaron durante 24, 48, 72 y 96 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y O₂ (a) al 21% (normoxia) y (b) al 8% (hipoxia). La proliferación celular se determinó mediante tinción con cristal violeta. Se obtuvieron curvas de crecimiento exponenciales, a partir de las cuales se calculó el tiempo de duplicación. Las líneas humanas CHL, HTB-52 y PLC/PRF5 y de rata McA-RH7777 mostraron un aumento significativo de la velocidad de proliferación en hipoxia. Así, respecto a la normoxia, el tiempo de duplicación se redujo drásticamente en CHL (32%) y PLC/PRF/5 (31%), siendo en HTB-52 un 13% menor y en McA-RH7777 un 9%. No observamos diferencias significativas en la velocidad de crecimiento celular en HuH7 ni en HepG2. Los resultados indican que las células tumorales de hepatoma CHL, HTB-52, PLC/PRF5 y McA-RH7777 acortan su ciclo celular en condiciones de hipoxia.

Nota: Financiado por Dpto. de Educación, Universidades e Investigación (Ayuda a Grupos, ref. IT514-10) y DCIT (proyecto SAIOTEK, ref.S-PE09UN54) del Gobierno Vasco.

P16-4

Immune and biochemists effects of melatonin in the acute sport training

MD. Maldonado¹, M. Manfredi¹, J. Ribas-Serna², H. Garcia-Moreno¹ y JR. Calvo¹

¹*Department Medical Biochemistry and Molecular Biology, Immunology Area, University of Seville Medical School, Seville,* ²*Andalusian Centre of Sport Medicine, Seville*

Acute sport training leads to a strong stimulation of muscle tissue and a change in the organism energy demands. This study was designed to investigate the effect of oral melatonin supplementation on human physiological functions associated with acute exercise. Immune, endocrine and metabolic parameters were measured in 16 young male football player, who were divided into two groups, an experimental group (supplementation with 6 mg of melatonin administered 30 minutes prior to exercise) and a control group (placebo without melatonin). They performed a continuous exercise of high intensity (135 beats/min). Samples were collected 30 minutes before the exercise and 3, 15 and 60 minutes after the exercise. The results indicated that the acute sport training presented: a) increased lipid peroxidation products (MDA) in both groups, control and experimental, with levels significantly decreased in the group treated with melatonin after 15 and 60 minutes of high-intensity exercise, b) the total antioxidant activity (TAS) was lower in the control group than in the experimental, the latter showing significant differences at 60 minutes of high-intensity exercise c) the lipid profile of subjects in the experimental group showed lower triglyceride levels than the control group after 15 and 60 minutes of high-intensity exercise, d) immunological studies only showed, in the experimental group, an increase in IgA levels at 60 minutes after the exercise, and finally there were no significant differences between the groups for any of the other variables. In conclusion these results indicated that treatment with melatonin in acute sports training reversed oxidative stress, improved defenses and lipid metabolism, which would result in an improvement in fitness.

P16-5

Influencia de las células de Kupffer (CK) en la activación de Nrf2 por hormona tiroidea (T₃) en hígado de rata

Luis Alberto Videla Cabrera¹, Pamela Romanque Ulloa¹, Catherine Santibáñez Cofré¹, Iván Castillo Montecinos² y Pamela Cornejo Zamorano³

¹*ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Comuna de Independencia (Chile),* ²*Universidad Católica del Maule, Comuna de Talca (Chile),* ³*Universidad Diego Portales, Comuna de Santiago (Chile)*

Nrf2 es un factor transcripcional redox-sensible involucrado en citoprotección. La administración de T₃a

ratas Sprague-Dawley (0,1 mg/kg ip) activó la vía del Nrf2 hepático evidenciado por el aumento en la relación nuclear/citosol de Nrf2 y el contenido de hemo-oxigenasa-1 (HO-1), glutamato-cisteína ligasa y tioredoxina (Western blot), proteínas antioxidantes controladas por Nrf2. Estos cambios fueron suprimidos por la depleción de las CK inducida por tratamiento con cloruro de gadolinio (GdCl₃; 10 mg/kg iv, 72 h previas a T₃), con inhibición de la fagocitosis de carbono coloidal (CC) y de la respuesta respiratoria asociada que genera especies reactivas del oxígeno (EROS), y aumento en la relación inhibidor de Nrf2 (Keap1)/Nrf2 nuclear que sugiere degradación de Nrf2. Además, la inhibición de NADPH oxidasa por apocinina (1,5 mmol/L en agua de bebida por 7 días antes de T₃) disminuyó significativamente la activación de Nrf2 inducida por T₃, la inducción de HO-1 y la respuesta respiratoria inducida por CC, sin cambios en la fagocitosis. Se concluye que las CK son esenciales para la activación del Nrf2 hepático por T₃, ya que la inhibición de la respuesta respiratoria asociada a producción de EROS por GdCl₃ o apocinina suprime la señalización de Nrf2.

Note: Financiado por FONDECYT 1090020.

P16-6

LMN diet, enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, protects SH-SY5Y neuroblastome cell line from hydrogen peroxide via Nrf2 pathway

**Laura Fernández-Fernández¹, Bartolomé Ramírez²,
Neus Anglés², Jordi Reguant², Jose Ramón
Morelló² y Mercedes Unzeta¹**

¹Instituto de Neurociencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, ²La Morella NUTS, Reus, Tarragona

Objectives: The aims of this work are to elucidate the neuroprotective effect of LMN in the oxidative stress induced human neuroblastome cells SH-SY5Y and to determine the molecular pathways involved.

Methods: SH-SY5Y cells treated with H₂O₂ were used to explore the antioxidant effect of LMN. Cytotoxicity of H₂O₂ was studied by measuring methylthiazol tetrazolium (MTT) and mitochondrial membrane potential by JC-1, a membrane-permeant dye. The fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was used to measure the production of reactive species (ROS). Dihydroethidine (DHE) was used to detect intracellular

superoxide and the expression of antioxidant enzymes was detected by western blot.

Results: LMN dose-dependently restored H₂O₂-induced ROS intracellular levels as well as the elevation of superoxide level. Pre-treatment with LMN markedly attenuated H₂O₂-induced cell viability loss as well as the loss of mitochondrial membrane potential.

The mechanisms by which LMN protected neuroblastome cell line from oxidative stress included the induction of antioxidant enzymes, Cu-Zn-superoxide dismutase (SOD1) and glutathione peroxidase (GPx) and the upregulation of Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2).

Conclusions: This results confirm the neuroprotective role of LMN, describing its antioxidant capacity and suggesting the route Nrf2-ARE as implied in its mechanism of action.

Note: Patent submitted. Reference WO2007063158.

P16m-7

Los estrógenos regulan la proteína desacoplante 2 (UCP2) a través del ERβ controlando la producción de radicales en las células epiteliales de mama

Jordi Sastre-Serra¹, Daniel G. Pons¹, Margaret Warner², Pilar Roca¹, Mercedes Nadal-Serrano¹, Jan-Ake Gustafsson² y Jordi Oliver¹

¹Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Institut Universitari Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears. CIBERobn (CE06/03), Instituto de Salud Carlos III, Palma de Mallorca, ²Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX (USA), and Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Novum (Sweden)

La proteína desacoplante 2 (UCP2) juega un papel muy importante en el control del estrés oxidativo. Estudios recientes han dado importancia a esta proteína en el cáncer, colocándola en el punto de mira como diana terapéutica. El objetivo de este estudio ha sido estudiar la presencia y actividad de la UCP2 en la glándula mamaria, así como observar si su expresión y actividad se ven afectadas por los estrógenos. Para ello se ha utilizado una línea celular que sobreexpresa el receptor de estrógenos beta (ERβ) de manera modulable por doxiciclina (T47D-ERβ), y cortes en parafina de glándulas mamarias de ratón wild type (WT) y knockout para el ERβ (BERKO). Se midieron los niveles de radicales libres (ROS) mediante DCFDA y se realizaron inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias para detectar la presencia de UCP2. Las tinciones inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes mostraron que la UCP2 se encuentra

presente en las mitocondrias de las células epiteliales de glándula mamaria. La sobreexpresión de ERβ en la línea celular incrementó la cantidad de UCP2, disminuyendo a su vez la producción de ROS. Además existe un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el promotor de la UCP2. Como prueba de la actividad de la UCP2, se trató a las células con Genipin (200 μM) inhibidor específico de la UCP2, observándose un aumento de la producción de ROS. Además, tratando a las células con 1nM de 17β-estradiol (E2) la producción de radicales iba disminuyendo a medida que aumentaba la cantidad de ERβ. Así pues, nuestros resultados muestran la presencia de UCP2 en la glándula mamaria, y que esta proteína está regulada por E2 a través de ERβ a nivel transcripcional en la glándula mamaria y tiene un efecto protector del estrés oxidativo.

P16-8

Efecto de la hormona tiroidea (T₃) sobre la vía de señalización Nrf2/Keap1 y su relación con la expresión de proteínas antioxidantes en hígado de ratas

Pamela Cornejo Zamorano¹, Pamela Romanque Ulloa² y Luis A. Videla Cabrera²

¹Universidad Diego Portales, Santiago (Chile), ²ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago (Chile)

La administración de T₃ produce estrés oxidativo (EO) hepático. Nrf2 es un factor transcripcional activado por EO, modula la expresión de genes citoprotectores. La activación de Nrf-2 involucra la participación del inhibidor Keap-1, que actúa como sensor redox y adaptador del complejo Cul3/Rbx1, controlando la degradación proteosómica de Nrf2. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la administración de T₃ sobre la activación de Nrf2, su relación con los niveles de Keap1, Cul3 y Rbx1, y su efecto sobre la expresión de genes antioxidantes, hemoxygenasa 1 (HO-1), glutamato-cisteína ligasa (GLC1) y tioredoxina (Trx). Se trataron ratas Sprague-Dawley con una dosis de 0,1 mg de T₃/kg de peso. La administración de T₃ produjo un aumento en los niveles de Nrf2 en núcleo y disminución en citosol, luego de 1 y 2 horas de tratamiento, respecto a controles ($p < 0,05$). Los niveles de Keap1 citosólico disminuyeron entre las 2 y 6 horas de tratamiento y los niveles nucleares se incrementaron entre las 4 y 8 horas ($p < 0,05$). No se observaron cambios significativos en los niveles de Cul3 y Rbx1. Los niveles citosólicos de HO-1, GLC1 y Trx aumentaron luego de 2 horas de tratamiento con T₃, respecto a controles ($p < 0,05$). Se concluye que la administración de T₃ activa a Nrf2 a tiempos tempranos (1-

2 horas), concordante con el aumento de la expresión de proteínas antioxidantes, con retorno a valores controles después de 4 horas asociado con el incremento en los niveles de Keap1 nuclear.

Nota: FONDECYT 1090020.

P16r-9

Cambios metabólicos en un modelo celular cardíaco de ataxia de Friedreich

Èlia Obis, Armando Moreno-Cermeño, Daniel Sanchís, Jordi Tamarit y Joaquim Ros
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad hereditaria que causa un daño progresivo al sistema nervioso dando como resultado síntomas que varían desde perturbaciones de la marcha y problemas del lenguaje, a la enfermedad cardíaca. Esta enfermedad afecta a alrededor de 1 de cada 50,000 personas y está causada por una mutación en el gen que codifica para frataxina, una proteína mitocondrial que se encuentra en bajas cantidades en los pacientes con FRDA. Aunque la función de frataxina aún no está clara, la hipótesis más aceptada apunta a un papel en el metabolismo del hierro dentro de la mitocondria. El fallo cardíaco es la causa principal de muerte en estos pacientes. Sin embargo, no se conocen los efectos de una disminución de frataxina en células cardíacas. En este contexto, nuestro grupo ha desarrollado un modelo cardíaco de deficiencia en frataxina usando cultivos primarios de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal, transducidos con virus que contienen shRNA anti-frataxina. Los análisis realizados en este modelo indican que la falta de frataxina provocaría cambios metabólicos en etapas tempranas que podrían ser el origen de las cardiopatías que se observan en la mayoría de pacientes con FRDA.

P16m-10

La activación de AMPK por el galato de epigallocatequina depende de la expresión de UCP2 mediada por especies reactivas de oxígeno en miotubos L6

Hugo Gonzalo Benito¹, José Serrano Casasola¹, Anna Cassanyé Riera¹, Alberto Espinel González², Marco Antonio Delgado², Maria Josep Bellmunt Curcó¹, Reinald Pamplona Gras¹, Manel Portero Otín¹ y Jordi Boada Pallàs¹

¹NUTREN Nutrigenomics, Universitat de Lleida/IRBLLEIDA, Lleida, ²Departamento de I+D, Grupo Leche Pascual, Aranda de Duero, Burgos

El galato de epigallocatequina (EGCG), la principal catequina del té verde (*Camellia sinensis*), se ha descrito como activador de AMPK mediante la estimulación de su fosforilación, a través de varios posibles mecanismos, en diversos modelos celulares in vitro y en animales de experimentación. Por otro lado, diversos estímulos, entre ellos las especies reactivas de oxígeno, pueden inducir la expresión de UCP2 a partir de su *pool* de mRNA. Por lo tanto, hipotetizamos que la expresión rápida de UCP2 conduciría a la activación de AMPK. Los resultados muestran que, en miotubos L6, la exposición aguda a EGCG a concentraciones similares a las medidas en individuos que ingieren infusiones de té verde de forma crónica, provoca un aumento paralelo de la expresión de AMPK y UCP2, sensible a cicloheximida. Paralelamente, el EGCG provoca un aumento del consumo de oxígeno total, y de la fracción insensible a oligomicina, mientras que los niveles intracelulares de ATP disminuyen. Los citados efectos del EGCG sobre parámetros de señalización y fisiología celular se revierten en presencia de antioxidantes y RNAs de interferencia contra UCP2. En conclusión, EGCG estimula la fosforilación de AMPK mediante el aumento de la expresión de UCP2, probablemente causada por las especies reactivas de oxígeno procedentes de la autooxidación del propio EGCG, provocando un desacoplamiento mitocondrial con la concomitante reducción del ATP intracelular que finalmente conduciría a la activación de AMPK.

P16r-11

Regulación de la diferenciación megacariocítica por SHP1 y SHP2

Guillermo López-Ruano¹, José L. Sardina², Beatriz Sánchez-Sánchez¹, Jesús Sánchez-Yagüe¹, Marcial Llanillo¹ y Angel Hernández-Hernández¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, ²Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC/Universidad de Salamanca, Salamanca

Recientemente hemos demostrado que la producción de ROS por una NADPH oxidasa dependiente de p22phoxes necesaria para conseguir la completa activación de las vías de señalización que regulan la diferenciación megacariocítica (Sardina et al *Cell Death & Diff* 2010; 17(12): 1842-54). Se piensa que una de las posibles dianas de los ROS podrían ser las proteína tirosina fosfatasa (PTP), ya que su actividad puede regularse por oxidación reversible. Nuestros datos muestran que la diferenciación

megacariocítica cursa con un descenso brusco de la actividad PTP al comienzo de la diferenciación. Además el tratamiento de las células con inhibidores de la actividad PTP es capaz de activar las vías de señalización necesarias para la diferenciación (ERK, PI3K/AKT o JAK/STAT), lo que desencadena el proceso de diferenciación. Estos datos sugieren que la inhibición de la actividad PTP por ROS es crucial para que se desencadene la diferenciación megacariocítica. Aunque tradicionalmente se ha aceptado el importante papel de SHP1 y SHP2 en la hematopoyesis, hasta donde nosotros sabemos no se ha estudiado el papel concreto de estas dos PTP en la diferenciación megacariocítica, por lo que nos ha parecido interesante analizar su posible función en este proceso de diferenciación. Para ello, hemos estudiado el efecto de la expresión ectópica de distintas versiones de ambas proteínas en la diferenciación, así como el efecto de la inhibición de su expresión mediante RNAi. Además estamos comenzando a analizar si la actividad de ambas PTP varía a lo largo de la diferenciación.

P16-12

La activación del sistema antioxidante de una especie halófila, *Spartina densiflora* Brong, en la base de su tolerancia a la sal y de su éxito adaptativo en ambientes salinos

David Martínez Domínguez, Antonio Canalejo, Francisco Córdoba García y Rafael Torronteras Santiago

Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva, Huelva

Spartina densiflora, Brong es una gramínea halófila de suelos altamente salinos del estuario de los ríos Tinto y Odiel (Huelva, España). La exposición a altas concentraciones de sal se ha descrito como inductora de estrés oxidativo. Hemos caracterizado la respuesta antioxidante de *S. densiflora* para evaluar su papel en la tolerancia a la sal. Se recolectaron plantas de *S. densiflora* de su medio natural y se transplantaron a condiciones no estresantes in vitro (28 días) regándolas con solución de Hoagland para plantas halófitas (4 g/l NaCl) (*periodo aclimatación*). Para estudiar el efecto de la salinidad, las plantas se mantuvieron durante otros 28 días (*periodo tratamiento*) en las mismas condiciones (Grupo Control) o suplementadas con NaCl (Grupo 25 g/l y Grupo 40 g/l NaCl). Se tomaron muestras de hoja para evaluar parámetros de crecimiento foliar y de estrés oxidativo. En la *aclimatación*, las concentraciones de H₂O₂ e

hidroperóxidos, así como las actividades peroxidadas (POD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) descendieron significativamente, al igual que la concentración de ascorbato total. Durante el *periodo de tratamiento*, ambas concentraciones hipertónicas elevaron los niveles de hidroperóxidos. La peroxidación lipídica no se indujo con 25 g/l NaCl, pero sí con 40 g/l NaCl. En ambos grupos hubo una drástica reducción del contenido de clorofilas y carotenos, que fue acompañada de un incremento en la concentración de ascorbato total y en actividades CAT y APX. La actividad POD fue inhibida. No hubo diferencias en el crecimiento foliar entre plantas control y tratadas. Los resultados sugieren que *S. densiflora* esta sometida a estrés oxidativo in situ y que su tolerancia al estrés salino está relacionada con la activación de mecanismos de defensa antioxidante.

y de la actividad de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, glutatión reductasa y catalasa. Además se determinó la concentración de proteínas totales y se valoró el estado general de los animales de experimentación durante dos meses. Los resultados sólo mostraron alteraciones significativas de las defensas antioxidantes en bazo, donde se encontró para todas ellas un aumento significativo de la actividad, especialmente para las M2, debida a la existencia de una disminución de las proteínas totales. Por ello, aunque la presencia de los nanohidrogeles genera pequeñas respuestas en el organismo, éstas no suponen un riesgo para la salud, y por tanto, podríamos considerarlos, a priori, como sistemas biocompatibles que pueden ser utilizados en la liberación controlada de fármacos.

Nota: Agradecimientos: MAT2010-21509-C03-03 y Grupos CAM-UCM GR35/10-A (Grupo 920613).

P16-13

Valoración del estrés oxidativo producido en hígado, riñón y bazo por la administración subcutánea de nanohidrogeles de N-isopropilamida, N-piridin-4-metil-acrilamida y (2-acriloilaminoetil) carbamato (90:5:5) a ratas Wistar

César Teijón López¹, Marta Álvarez Paino², Marta Benito Miguel², Rosa Olmo López², María Dolores Blanco Gaitán² y José María Teijón Rivera²

¹Departamento de Enfermería. E.U. Enfermería, Fisioterapia y Podología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

El desarrollo de la nanotecnología hace que los nanomateriales sean muy útiles en ámbitos como la biomedicina, donde, por su capacidad para embeber moléculas en su interior, son aplicables en el transporte y liberación controlada de fármacos. Pero estos materiales pueden generar efectos adversos en el organismo, cuyo conocimiento es necesario antes de su aplicación. El objetivo de este estudio es la evaluación de la biocompatibilidad de nanohidrogeles, mediante el análisis del estrés oxidativo en hígado, riñón, y bazo de ratas Wistar. Los nanohidrogeles, denominados M1 y M2, están compuestos por N-isopropilamida, N-piridin-4-metil-acrilamida y (2-acriloilaminoetil) carbamato (90:5:5), con 5% y 3% de entrecruzante respectivamente. Las dosis administradas fueron 28mg (M1) y 48mg (M2) por inyección subcutánea. El estrés oxidativo se evaluó mediante la determinación de la concentración de glutatión

P16-14

Label-free analysis of mitochondrial toxicity by multispectral image-in-flow cytometry using cells expressing eGFP-LON protease

Francisco Sala-de Oyanguren¹, Guadalupe Herrera¹, Sandra Pinto¹, Lara Gibellini², Marcello Pinti², Andrea Cossarizza² y Jose-Enrique O Connor¹

¹Laboratory of Cytomics, Mix Unit CIPF-UVEG, University of Valencia-Prince Felipe Research Center, Valencia, ²Department of Biomedical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena (Italy)

Mitochondrial dysfunction is related to many aspects of cytotoxicity, and mitochondrial network changes in drug-induced toxicity and apoptosis. We have set up a label-free assay of early cytotoxicity based on mitochondrial morphometry using multispectral image-in-flow cytometry (MsiFC) and drugs causing mitochondrial alterations or apoptosis on a human liposarcoma cells expressing GFP-LON protease. SW872/GFP cell line was obtained by transfection with pMSCV retroviral vector containing the fusion cDNA for human wild type LON protease and eGFP. To evaluate this cell model, we applied ImageStream 100 (Amnis Corp., Seattle, USA), that combines quantitation by flow cytometry and high content analysis by fluorescence imaging. Colocalization of GFP and fluorescent probes for mitochondrial membrane potential and mitochondrial superoxide generation was examined in cells treated with uncouplers and prooxidants. The percentage of GFP+ cells was not affected by treatments and GFP fluorescence

intensity was not affected by uncouplers but decreased significantly with oxidative stress. In xenobiotic-treated cells, variations in morphometric features of mitochondrial network were related to early changes in cell function and apoptosis.

Note: Sponsored by MICINN (BIO2010-19870), Generalitat Valenciana (FPA2010-019) and the University of Valencia (visiting professorship grant to A.C.).

P16-15

Estrés oxidativo en el carcinoma gástrico. Efecto de la resección tumoral sobre los niveles en sangre y orina de MDA y 8-oxo-dG

Silvia Borrego¹, Concha Cerdá¹, Lisardo Boscá², María Pimentel², Antonio Vázquez³, Francisco Dasí⁴, Juan Montoro⁵, Ana Bediágo¹, Carmen Tormos⁶, Marwan Muhana⁶, Julia Sánchez⁶ y Guillermo Sáez⁷

¹*Servicio de Análisis Clínicos CDG-HGUV, Valencia,* ²*Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Valencia,* ³*Servicio de Cirugía General, HGUV, Valencia,* ⁴*Fundación de Investigación, Hospital Clínico Universitario, Valencia,* ⁵*Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Valencia,* ⁶*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, Valencia,* ⁷*Servicio de Análisis Clínicos CDG-HGUV. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València, Valencia*

Un gran número de procesos degenerativos presentan en su mecanismo fisiopatogénico alteraciones metabólicas que conducen al estrés oxidativo (EO) que induce modificaciones oxidativas en moléculas claves para la regulación de la homeostásis celular. La oxidación del DNA genera como producto la base modificada y mutagénica 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) cuya reparación tiene lugar de forma efectiva por os específicas. 8-oxo-dG se repara y se elimina por la orina lo que permite utilizar este metabolito como marcador de EO en distintos procesos degenerativos. En el presente trabajo hemos estudiado los niveles de EO y la expresión de los enzimas de reparación de DNA en el tejido tumoral de pacientes con carcinoma gástrico (CG). Se han cuantificado las concentraciones de MDA y 8-oxo-dG en sangre y orina de los pacientes antes y después de la intervención quirúrgica. Se han utilizado técnicas cromatográficas enzimáticas e inmunológicas para el análisis de los productos de oxidación y la técnica de RT-PCR para el estudio de la expresión de proteínas de reparación de DNA (HOGG1,

RAD51, MUTYH, MTH-1). El tejido tumoral presenta niveles significativamente elevados de MDA, GSH y 8-oxo-dG con respecto a la mucosa sana del mismo paciente. Las células tumorales expresan enzimas de reparación de DNA con mayor intensidad que el tejido sano del mismo paciente. 8-oxo-dG y MDA aumentan significativamente en las células mononucleares circulantes de los pacientes con CG. La 8-oxo-dG se elimina por la orina con niveles significativamente más elevados en el grupo de enfermos. Este valor disminuye progresivamente tras la resección tumoral hasta alcanzar valores próximos a los del grupo control.

P17. Estructura y Función de las Proteínas

P17-1

Evaluación de las interacciones de la toxina Kid, la antitoxina Kis y la región promotora parD por espectrometría de masas nativa

Elizabeth Diago-Navarro¹, Ana María Hernández-Arriaga¹, Arjan Barendregt², Albert JR Heck² y Ramón Díaz-Orejas¹

¹*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid,* ²*Utrecht University, Utrecht (The Netherlands)*

Los sistemas toxina-antitoxina se encuentran en plásmidos y cromosomas de bacterias y arqueas donde juegan un papel importante en respuesta a estrés, mantenimiento de regiones genómicas y estabilidad plasmídica. El sistema *parD* del plásmido R1 de enterobacterias, se compone de la toxina Kid, RNasa capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, y la antitoxina Kis. Ambas participan en la regulación transcripcional del sistema. La espectrometría de masas nativa (EMN), técnica que permite el estudio de complejos macromoleculares de proteínas-proteínas o proteínas-ácidos nucleicos, ha permitido evaluar la actividad RNasa de Kid [1], los complejos que ésta forma con la antitoxina Kis, a diferentes relaciones estequiométricas [2] y qué complejos KisKid se unen a la región promotora-operadora [3]. El operador de *parD* tiene dos repeticiones invertidas homólogas, I y II, de unión de Kis o de complejos KisKid [3]. La estequiometría Kis:Kid es importante para la formación de un complejo represor eficiente, el octámero (Kis₂-Kid₂)₂ [3]. En esta ocasión hemos utilizado la EMN para evaluar las interacciones de Kis y Kid con un fragmento de DNA de 175pb que contiene

las dos regiones. Kis y Kid se unen en forma de octámero a cada uno de los sitios (I y II) independientemente. Los datos indican que Kid regula el espaciado entre dímeros de antitoxina Kis requerido para una unión eficiente del represor al DNA. La relación Kis:Kid es importante para que ambos sitios estén ocupados por un octámero. Mediante mutagénesis dirigida se ha analizado el papel de ambas regiones en la unión de las proteínas con un DNA de 175pb que contiene los dos sitios o por separado.

[1] Diago-Navarro E *et al.* *FEBS J* 2009.

[2] Kamphuis MB *et al.* *Proteins* 2007.

[3] Monti MC *et al.* *Nucleic Acids Res* 2007.

P17r-2

Zampanolida, un novedoso agente estabilizador de microtúbulos que une covalentemente al sitio del paclitaxel

Benet Pera Gresely¹, Jessica J. Field², Enrique Calvo³, Angeles Canales⁴, Didier Zuwerra⁵, Chiara Trigili¹, Arun Kanakkanthara², John Wakefield⁶, Jonathan Singh², Javier Rodríguez-Salarish¹, Ruth Matesanz¹, Jesús Jiménez Barbero¹, Peter T. Northcote², John H. Miller², José Antonio López³, Ernest Hamel⁷, Isabel Barasoain¹, Karl-Heiz Altmann⁵ y José Fernando Díaz¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ²Victoria University of Wellington, Wellington (Nueva Zelanda), ³Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid,

⁴Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ⁵Swiss Federal Institute of Technology, (Suiza),

⁶Wellington School of Medicine and Health Sciences, Wellington (Nueva Zelanda), ⁷National Institutes of Health, Frederick (USA)

La zampanolida es una potente molécula citotóxica aislada originalmente de extractos crudos de la esponja *Fasciospongia rimosa* colectada en Okinawa [1], que posteriormente se aisló también en extractos de la esponja *Cacospongia mycofijiensis* colectada en Tonga, con capacidad estabilizante de microtúbulos. La zampanolida promueve el ensamblaje de tubulina deteniendo las células en la fase G2/M e induciendo un proceso de muerte celular por apoptosis [2]. Nosotros hemos caracterizado y descrito un nuevo patrón químico de agentes estabilizantes de microtúbulos, el de la zampanolida, estudiando también el análogo sintético (-)-dactilolida que carece de la cadena lateral. Dichos compuestos compiten con el paclitaxel y sus biomiméticos por el sitio de unión en la tubulina e inducen su ensamblaje de un modo dependiente de magnesio a

microtúbulos estables al frío y a altas concentraciones de calcio. El mecanismo de acción de la zampanolida y la dactilolida implica la unión covalente a residuos cercanos al poro tipo I del microtúbulo, apreciándose diferencias en el modo de unión de los dos compuestos. Mediante resonancia magnética nuclear hemos determinado la conformación de la dactilolida unida y libre empleando estudios de TR-NOESY, así como los epítomos de unión realizando estudios de STD. La identificación de los residuos de la tubulina a los que la zampanolida une covalentemente se ha llevado a cabo mediante técnicas de espectrometría de masas. El residuo marcado por la zampanolida resulta ser Asn-228, que localiza en el sitio interno del paclitaxel y al que, al igual que la ciclostreptina [3], la zampanolida une covalentemente ejerciendo su actividad estabilizante de microtúbulos.

[1] *Tetrahedron Letters* 37: 5535-8.

[2] *J Med Chem* 22: 7328-32.

[13] *Nat Chem Biol* 2: 117-25.

P17-3

Caracterización biofísica de la proteína E2-C de *Carassius auratus*

David Aguado Llera¹, Rosa María Domenech¹, Marco Marenchino² y José Luis Neira³

¹Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Elche, ²Unidad de Espectroscopía y RMN. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, ³Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández, Elche. Instituto de Biocomputación y Física de los Sistemas Complejos. Universidad de Zaragoza, Zaragoza

En eucariotas, la ubiquitinación es un mecanismo que puede desencadenar la reorganización de complejos de proteínas, cambios en la localización de las mismas o, incluso, su degradación. Para entender qué destino puede seguir una proteína tras su ubiquitinación, es importante conocer el mecanismo por el cual se produce. En general, una enzima activadora (E1) transfiere una molécula de ubiquitina a una proteína transportadora (E2), que a su vez, transferirá dicha molécula a una ubiquitina ligasa (E3). La proteína E2-C pertenece a la familia de proteínas transportadoras de ubiquitina. Está implicada en la transferencia de moléculas de ubiquitina al ciclosoma, el complejo de proteína de tipo ciclina que regula la mitosis celular, concretamente a la proteína ciclina B, marcándola así para su degradación.

Aunque existen diversos trabajos que caracterizan la función de la proteína E2-C, hasta la fecha no hay información acerca de las características biofísicas de la misma. En el presente estudio, y mediante la aplicación de

diversas técnicas espectroscópicas, damos respuesta a estos interrogantes.

P17r-4

Estudio de la sensibilidad a inhibidores de las quinasas humanas VRK1 y VRK2 y su homóloga B1 del virus *Vaccinia*

Marta Vázquez-Cedeira¹, Iria Barcia-Sanjurjo², Marta Sanz-García¹, Ramiro Barcia² y Pedro A. Lazo¹

¹Centro de Investigación del Cáncer. CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca,

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. Lugo, Spain, Lugo

Las quinasas humanas VRK1 y VRK2 (*Vaccinia-related kinases*) son serina-treonina quinasas implicadas en el control de la entrada en el ciclo celular, en apoptosis y en autofagia, y modulan la señalización de las MAPK (*mitogen activated protein kinases*). Las diferencias estructurales que presentan en sus sitios catalíticos con respecto a otras quinasas las hace apropiadas para el desarrollo de inhibidores específicos. En este trabajo, hemos determinado la sensibilidad de VRK1, VRK2 y su homóloga viral B1 a inhibidores conocidos de quinasas. Las proteínas VRK y B1 son inhibidas débilmente por compuestos descritos como inhibidores de Src, MEK1, B-Raf, JNK, p38, CK1, ATM, CHK1/2 y DNA-PK, e incluso muchos de estos inhibidores no tienen efecto a la concentración de 100 μ M. A pesar de su baja sensibilidad, algunos de los inhibidores utilizados son capaces de diferenciar entre VRK1, VRK2 y B1. Así, VRK1 es más sensible a estaurosporina, RO 31-8220 y TDZD-8; mientras que VRK2 es más sensible al inhibidor de Cdk1, roscovitina, RO 31-8220, AZD7762 e IC261. Por su parte, B1 es más sensible a estaurosporina, KU55933 y RO 31-8220, pero no a IC261. Además, las tres quinasas presentan un patrón diferente de sensibilidad para cada compuesto, ya que la dosis a la que son inhibidas difiere entre las tres proteínas. Esta respuesta diferente a inhibidores conocidos aporta información sobre la estructura química de compuestos que puedan ser específicos para VRK1 y VRK2 con ninguna o muy baja inhibición sobre otras quinasas. El desarrollo de inhibidores de VRK1 altamente específicos sería interesante para uso clínico en cánceres donde estas quinasas identifican un subtipo con peor pronóstico como es el caso de VRK1 en cáncer de mama.

P17-5

Estudio de la endocitosis, transporte intracelular y actividad apoptótica de las RIP ebulina y nigrina en células en cultivo

Lucía Citores González¹, Rosario Iglesias Álvarez¹, José Miguel Ferreras Rodríguez¹ y Sjur Olsnes²

¹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, Valladolid, ²Department of Biochemistry, Institute for Cancer Research. The Norwegian Radium Hospital, Oslo (Noruega)

La ebulina l y la nigrina b son proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) de dos cadenas aisladas de especies del género *Sambucus*. Presentan una estructura similar a la de las clásicas RIP de tipo 2 como la ricina, con una cadena A que posee actividad N-glicosidasa del 28S rRNA y una cadena B con actividad lectina. Todas ellas provocan la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas. La ebulina l y la nigrina b son poco activas en células de mamíferos cultivadas y en ratones hasta concentraciones muy elevadas, aunque desde el punto de vista de la actividad enzimática antirribosómica son proteínas muy similares a la ricina. En este trabajo hemos estudiado la unión, endocitosis, degradación y reciclaje de la ebulina l y la nigrina b comparándolas con la ricina. Los resultados indican que las células presentan un número más bajo de sitios de unión para estas toxinas que para la ricina y se degradan más lo que conlleva una concentración intracelular más baja. Esto junto a que siguen una ruta intracelular distinta de la ricina, podría explicar su baja toxicidad en células. Por otro lado, mediante varios métodos como la acidificación del citosol que bloquea la endocitosis desde vesículas recubiertas o la utilización de células HeLa dynK44A que expresan una dinamina mutada bajo el control de tetraciclina y por tanto en estas células la endocitosis dependiente de clatrina y cavolae está bloqueada, hemos concluido que estas proteínas se endocitan mayoritariamente por una vía alternativa a la dependiente de clatrina. Por otra parte hemos determinado que la ebulina l y la nigrina b provocan la degradación del DNA genómico, consistente con apoptosis, de forma paralela a la inhibición de síntesis de proteínas en células en cultivo.

P17-6

RepA-WH1 synthetic prionoid: DNA and Hsp70-promoted amyloidosis in bacteria

María Moreno del Álamo¹, Cristina Fernández¹, Fátima Gasset-Rosa¹, Laura Molina¹, Ana Serrano¹, Susana Moreno², Elena Fernández-Tresguerres¹ y Rafael Giraldo¹

¹Departamento de Biología Físico/Química, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid,

²Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Madrid

The complexity of the processes leading to the development of amyloid proteinopathies is counterbalanced by their universal structural basis (the amyloid crossed β -sheets) [Greenwald and Riek, 2010]. This has fueled the quest for disease-unrelated model systems suitable to study protein amyloidosis under quasi-physiological conditions *in vitro* and in simpler organisms *in vivo*. Yeast prions have provided several of such model systems, yielding invaluable insights on amyloid structure, dynamics and transmission [Wickner et al, 2007]. However, these biological agents have not been found in bacteria. We have reported that engineering RepA-WH1, a bacterial DNA-toggled protein conformational switch (dWH1->mWH1) functional in plasmid replication [Giraldo et al, 2003], enables DNA-modulated control on protein amyloidogenesis *in vitro* [Giraldo, 2007]. RepA-WH1 thus shares some analogies with nucleic acid-promoted replication of the mammalian prion (PrP^C->PrP^{Sc}) [Silva et al, 2008]. RepA-WH1 expression gives way to a non-infectious, vertically-transmissible amyloid proteinopathy in *E. coli*: RepA-WH1 amyloid aggregates efficiently promote aging in bacteria, which exhibit a lengthening in generation time, a limited number of division rounds and reduced fitness. These amyloid inclusions have the ability to template the transformation and assembly into fibers of soluble RepA-WH1 molecules *in vitro* [Fernández-Tresguerres et al, 2010]. We show here that DnaK, the Hsp70 chaperone in *E. coli*, but not ClpB (Hsp104) is required to assemble RepA-WH1 amyloids *in vivo*, albeit DnaK can be forced to disassemble amyloids fibers *in vitro*. The RepA-WH1 prionoid opens direct means to untangle a general pathway for protein amyloidosis in a host with reduced genome and proteome [Giraldo et al, 2011].

P17r-7

Estudio funcional de residuos implicados en las actividades riboflavina kinasa y adenililtransferasa de la FAD sintetasa de *Corynebacterium ammoniagenes*

Ana Serrano¹, Susana Frago¹, Adrián Velázquez-Campoy² y Milagros Medina¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular e Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²Fundación ARAID. Diputación General de Aragón. Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Las formas biológicamente activas de la riboflavina, FMN y FAD, participan en multitud de procesos biológicos esenciales para las células. Su síntesis a partir de RF tiene lugar mediante la acción secuencial de dos actividades enzimáticas, una riboflavina kinasa (RFK) y una adenililtransferasa (FMNAT). En procariontes ambas actividades residen en una única proteína, la FAD sintetasa (FADS), sin embargo, en mamíferos y levaduras, la síntesis de FMN y FAD está catalizada por dos enzimas monofuncionales que actúan independientemente, bien con actividad RFK o FMNAT. Las características diferenciales de estas actividades en distintos organismos convierten a la FADS en una potencial diana terapéutica. El análisis secuencial y estructural de la FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* ha permitido sugerir los aminoácidos H28, H31, R161, S164 y T165 en el módulo FMNAT y T208, N210 y E268 en el módulo RFK como posibles residuos implicados en las respectivas actividades catalíticas. Se han generado mutaciones en estas posiciones con el fin de estudiar el efecto que tiene su sustitución en la unión a los ligandos y en los parámetros cinéticos de las actividades RFK y FMNAT. Los resultados indican que estos residuos son críticos para mantener la geometría de los sitios activos y permitir la unión de los ligandos en una orientación adecuada para que se produzca la catálisis. En base a los resultados cinéticos hemos podido proponer el orden de unión de los ligandos durante la actividad catalítica de cada módulo. Además los resultados avalan el papel que tiene cada uno de los dominios en modular la eficiencia en la actividad catalítica del otro módulo mediante la formación de ensamblados oligoméricos transitorios tal como sugiere la estructura oligomérica resuelta para este enzima.

P17r-8

Papel de los residuos Ser59 y Ser80 en la estabilización del complejo catalíticamente competente proteína-coenzima en la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de *Anabaena* PCC7119

Ana Sánchez Azqueta¹, Marta Martínez Júlvez² y Milagros Medina Trullenque²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza. , Zaragoza,

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza

En los organismos fotosintéticos, la enzima responsable de la producción de NADPH es la ferredoxina-NADP⁺ reductasa. Esta proteína FAD-dependiente toma dos electrones de dos moléculas reducidas de ferredoxina y los transfiere a una molécula de NADP⁺ en un único paso de transferencia de hidruro. A pesar de que el mecanismo de reconocimiento y transferencia de hidruro entre NADP⁺/H y FNR ha sido ampliamente estudiado, aún no se conocen todos los parámetros que rigen este proceso. En el entorno del sitio de unión del anillo de isoalloxazina del FAD hay una serie de residuos que se encuentran altamente conservados entre los miembros de la familia estructural de la FNR (S59, S80, C261, E301 y Y303), además de dos moléculas de agua que contribuyen a la formación de una red de enlaces por puente de hidrógeno en el sitio activo. Así, en la proteína oxidada, S80 interacciona con S59 y E301, y a través de una molécula de agua conservada con el N5 del FAD y con Y303. Estudios de dinámica molecular han mostrado que tras la reducción de la flavina, el puente de hidrógeno con E301 se rompe, y se produce una ligera reorganización en el sitio activo. Con objeto de esclarecer el papel que juega la red de puentes de hidrógeno a la que contribuyen estos residuos tanto en la estabilización del coenzima como en el proceso de transferencia de hidruro, hemos producido y caracterizado dos variantes de FNR de *Anabaena*: S59A y S80A. Sus propiedades espectrales y cinéticas, y las estructuras cristalográficas obtenidas mediante difracción de rayos X han confirmado la contribución de ambos residuos en la estabilización de un complejo catalíticamente competente FNR-NADP⁺.

P17-9

Diverse structural features in protein complexes of the intrinsically disordered and amyloidogenic protein α -synuclein

Carlos Bertocini¹, Santiago Esteba-Martin¹, Bryn Fenwick¹, Cintia Roodveldt², Gabriele Schierle-Kaminski³, Clemens Kaminski³, Christopher Dobson³, Xavier Salvatella¹ y John Christodoulou⁴

¹Institute for Research in Biomedicine Barcelona, Barcelona, ²CABIMER-Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine, Sevilla, ³University of Cambridge, Cambridge (UK), ⁴University College London, London (UK)

⁴University College London, London (UK)

The presence of intrinsically disordered regions is a very important feature of proteins involved in interaction networks, in which the absence of defined secondary structural elements provides a high degree of plasticity that allows interaction with multiple partners. Failure to maintain the abundance of intrinsically disordered proteins (IDPs) is at the root of several major diseases. We are studying a number of binary and ternary protein-protein complexes that involve the small pre-synaptic IDP α -synuclein (AS), associated with the onset of Parkinson's disease. Using multidimensional NMR, fluorescence spectroscopy and microscopy we determined the impact that the complexes have on the structure of the protein and its consequences for amyloid fibril formation. The complex with the chaperone Hsp70 strongly reduces amyloidogenicity of AS impeding intermolecular hydrophobic interactions without inducing significant folding in the protein. On the other hand, the complex with the Calcium regulatory protein Calmodulin only weakly reduces amyloid formation by selectively binding conformations of the protein with increased helical content. Employing FRET-based fluorescence microscopy we are currently characterizing the impact protein interactions have on AS aggregation in cells in culture and in animal models of disease. Our data demonstrate that in amyloidogenic disordered proteins limiting accessibility of aggregation-prone regions and conformational selection towards more folded conformers are two possible mechanism by which interaction partners could modulate the onset of toxic species in amyloid-related diseases.

P17-10

Hacia la caracterización de cambios conformacionales asociados a la unión de ligandos y transmisión de la señal alostérica en la carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1)

Belén Barcelona Andrés, Jesús Rodríguez Díaz, Roberto Gozalbo Rovira, David Dufour Rausell, Vicente Fresquet Arnau y Javier Cervera Miralles
Reconocimiento Molecular. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia

La carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1) es un polipéptido multidominio que cataliza el primer paso del ciclo de la urea en una reacción compleja que ocurre en tres etapas ($2\text{ATP} + \text{bicarbonato} + \text{amonio} = 2\text{ADP} + \text{fosfato} + \text{carbamil fosfato}$) y que tiene un requerimiento absoluto de su activador N-acetilglutamato (NAG). La enzima posee dos sitios activos que llevan a cabo cada uno una reacción de fosforilación de un modo coordinado que mantiene estrictamente la estequiometría de la reacción CPS. Diferentes evidencias indirectas postulan la existencia de importantes cambios conformacionales para concertar los pasos reaccionales.

Pretendemos explorar la existencia de cambios conformacionales en la CPS1 subsiguientes a la unión de ATP, amonio y NAG, usando tres anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CPS1 sensibles a la unión de ligandos y cuyos epitopos los identificamos sobre los sitios activos de la CPS1 (18A2 y B5A20 reconocen el sitio de fosforilación de bicarbonato y 13D el de carbamato). Además de la forma silvestre de la enzima utilizamos dos mutantes clínicos que afectan a residuos que interfieren en la transmisión de la señal alostérica inducida por la unión de NAG (T451 y R1453) y un tercer mutante (pA438P) que podría perturbar el túnel intramolecular. Los resultados muestran que la presencia de ligandos modifica el reconocimiento de la CPS silvestre por los mAbs y que estos patrones de inmunoreconocimiento cambian en CPS mutantes para alguno/s de los ligandos. Estos hallazgos revelan la existencia de cambios conformacionales asociados a la unión de ligandos y podrían ayudar a esclarecer los mecanismos de transmisión de la señal alostérica y de coordinación de los centros activos.

Nota: Ayuda SAF2010-17993.

P17-11

The active site of human Mn(II)-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase or ADPRibase-Mn: a mutagenesis study

Alicia Cabezas¹, Ascensión Fernández¹, José Canales¹, João Meireles Ribeiro¹, Rosa María Pinto¹, Iralis López-Villamizar¹, Joaquim Rui Rodrigues², María Jesús Costas¹ y José Carlos Cameselle¹

¹*Grupo de Enzimología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, Badajoz,*
²*Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria (Portugal)*

ADPRibase-Mn (AM) proteins form a family within the metallophosphoesterase (MP) superfamily. Among animals, the AM family is restricted to vertebrates. In rodents, where AM has been biochemically studied, it shows higher expression in immune cells. The structure of zebrafish (z) AM is solved, and its active site defined by a dimetallic center with a bound bidentate water ($W < 2\text{Me}$) accessible to substrates in the bottom of a cavity. In this site, zAM crystals contain P_i and substrates ADP-ribose (Ar), CDP-choline (Cc) and 2',3'-cAMP (23cA) dock such that: (1) the scissile P-O bond is in line with W, (2) the (P-)O atom is at H-bond distance of a His residue, and (3) the phosphates lay near an Arg chain. On top of the active-site cavity, Tyr and Leu face to each other, and could interact with the substrate nitrogen base. A theoretical structure of human (h) AM modeled from zAM is available and shows those four amino acids conserved (with Phe substituting for Tyr). We cloned and expressed hAM, and found it active on Ar, Cc and 23cA with similar k_{cat} ($35\text{-}60\text{ s}^{-1}$), the best substrate being Ar by its lower K_m ($60\text{ }\mu\text{M Ar}$, $350\text{ }\mu\text{M Cc}$ and $2400\text{ }\mu\text{M 23cA}$). We constructed H111A, H111N, R43A, F37A, F37Y and L196A-hAM point mutants and, from their kinetic parameters, concluded that: (1) R43 is critical for catalysis and NDP-X specificity, as R43A-hAM showed ≥ 2000 -fold decreased k_{cat} s but only several-fold increased K_m s for Ar and Cc, with smaller effects for 23cA; (2) F37 is key to the hAM preference for Ar, as F37A-hAM showed similar K_m for Ar and Cc, the latter resulting its best substrate; (3) H111 facilitates also the attack by $W < 2\text{Me}$, as in other MP families. Interestingly, F37 and R43 are conserved only in the closest AM homologues as part of a 10-amino acid motif.

P17-12

Interaction of the precursor of pulmonary surfactant protein SP-B (rproSP-BΔC) with phospholipid membranes

Elena Lopez-Rodriguez¹, Elisa J Cabré², Erik Goormaghtigh³ y Jesus Perez-Gil¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, ²Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ³Structure et Fonction des Membranes Biologiques, Center for Structural Biology and Bioinformatics, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles (Belgique)

Pulmonary surfactant is a complex mixture of lipids and proteins lining the respiratory alveolar surface. SP-B is an essential protein in lung surfactant and plays a key role to facilitate assembly and dynamics of surfactant lipid/protein complexes. SP-B is synthesized in type II pneumocytes as a pro-protein, in which the mature SP-B module is flanked by C-terminal and N-terminal domains. These two flanking domains are cleaved in vivo during the pH-dependent maturation of SP-B, which occurs along its transit to lamellar bodies (LBs), the organelles where surfactant membranes are stored in pneumocytes. Only the N-terminal domain is essential for proper sorting and secretion of the mature protein upon assembly of surfactant in LBs. As the precursor forms of SP-B do not accumulate in cells, we have produced precursor variants lacking the C-terminal domain (human proSP-BΔC) as recombinant proteins in *E. coli*.

In previous work we had shown that rproSP-BΔC, produced in *E. coli* and purified from inclusion bodies solubilized with urea, was able to interact with different membranes made of saturated (DPPC), unsaturated and zwitterionic (POPC) or anionic (POPG) phospholipids. We have now optimized a new procedure to obtain recombinant soluble forms of rproSP-BΔC in *E. coli*, without using denaturing conditions, and we have characterized the interaction between rproSP-BΔC and different phospholipid membranes by means of fluorescence and infrared spectroscopy, as a function of pH.

P17-13

Estudio del ensamblaje de algunas proteínas ribosómicas de la subunidad grande de los ribosomas de *Saccharomyces cerevisiae*

Francisco José Espinar Marchena, Antonio Fernández Pevida y Jesús De la cruz Díaz

Departamento Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla

La síntesis y ensamblaje del ribosoma eucariota es un proceso altamente complejo en el que participan más de un centenar de proteínas, denominadas genéricamente factores de actuación en trans, que se asocian a las proteínas y RNA ribosómicos en partículas prerribosómicas. La contribución de estos factores a la síntesis de ribosomas se ha estudiado exhaustivamente a diferencia de las proteínas ribosómicas. Nuestro grupo está interesado en comprender cómo y cuándo se ensamblan las proteínas ribosómicas eucarióticas y para ello usamos como modelo *Saccharomyces cerevisiae*. En esta presentación, se discutirán nuestros últimos resultados en el estudio del papel que cumplen las proteínas ribosómicas L3, L14 y L40 de la subunidad grande 60S. Nuestros datos sugieren que L3 participa en las reacciones tempranas del ensamblaje de subunidades 60S y en el transporte de complejos pre-60S al citoplasma. Actualmente, estamos caracterizando mutantes dominante negativos. L40 es el resultado C-terminal de la rotura endoproteolítica de un precursor, Ubi1/2, que contiene una molécula N-terminal de ubiquitina. En esta trabajo, presentaremos las consecuencias durante la biogénesis de ribosomas de la pérdida de función de L40 y nuestros datos de interacción obtenidos mediante escrutinios de letales sintéticos. Finalmente, se discutirán los últimos resultados obtenidos con la proteína L14. Todos nuestros estudios confirman que las proteínas ribosómicas no son meros componentes pasivos sino que cumplen funciones específicas durante la síntesis de ribosomas.

P17-14

Comparison of the RNase 3 binding mode to nucleic acids and glycosaminoglycans

Vivian Salazar¹, Marc Torrent², Mohammed Moussaoui¹, M. Victòria Nogués¹ y Ester Boix¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Departamento de Ciencias Experimentales de la Salud. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

We are working on the human members of the vertebrate RNase superfamily involved in host defense. The bovine pancreatic RNase A is the family reference prototype and its active center architecture reveals several phosphate binding subsites adjacent to the main catalytic site which contribute to align the RNA. Together with a primary role in RNA digestion in ruminants for the RNase A, a variety of non-catalytical biological properties were described for the other family members. The antibacterial activity of distant related RNases suggested that the family evolved from an ancestral host-defense function.

The 8 human RNases, with a low primary sequence identity, share a common three-dimensional fold. Together with the conserved catalytic triad, some variability is found for the residues involved in secondary binding sites. In particular, structural analysis on RNase 3, an antimicrobial RNase secreted by eosinophils during inflammation, identifies cationic residues that contribute to the protein substrate specificity. Interestingly, we have found that the protein surface cationic residues are also involved in the protein binding to polyanionic heterosaccharide molecules, as lipopolysaccharides at the Gram -negative outer membrane and glycosaminoglycans (GAGs) at the host cell extracellular matrix. We present here a comparative docking analysis using both RNA and GAGs analogs. The results indicate that the substrate anchoring residues can also serve to fix the sugar probes, potentially contributing to the protein cytotoxicity.

Note: Financiado por MICINN (BFU2009-09371), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 795) y Colciencias.

P17-15

Estructura del dominio plakina de plectina

Esther Ortega¹, Rubén M. Buey¹, Arnaud Sonnenberg² y José M. de Pereda¹

¹*Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-USAL, Salamanca, ²Netherlands Cancer Institute, Amsterdam (The Netherlands)*

Las plakinas interconectan los sistemas del citoesqueleto y los anclan a complejos de adhesión asociados a membranas. En mamíferos esta familia incluye: plectina, desmoplakina, BPAG1, MACF1, envoplakina, perioplakina y epiplakina. Alteraciones, hereditarias o adquiridas, de plakinas causan patologías severas que afectan a epitelios (principalmente piel), músculo y sistema nervioso. Las plakinas, excepto epiplakina, contienen una región conservada denominada dominio plakina (~1000 residuos) que determina la localización subcelular de cada plakina. El dominio plakina está formado por nueve *spectrin repeats* (SR1 a SR9) y un dominio SH3 que está insertado en el SR5. Aquí hemos combinado cristalografía y dispersión de rayos-x a bajo ángulo (SAXS) para elucidar la estructura del dominio plakina de plectina. Por un lado hemos resuelto la estructura cristalográfica de 7 fragmentos, cada uno de los cuales incluye de 2 o 3 SR y que, en conjunto, incluyen todos los subdominios (SR y SH3) del dominio plakina. A partir de estas estructuras hemos ensamblado modelos de regiones más amplias del dominio plakina que han sido validados con datos de SAXS. Colectivamente, el dominio plakina presenta una estructura alargada en forma de varilla.

P17-16

Inhibición de la calcio ATPasa de retículo sarcoplásmico por TBT

Scheherezade García Carrillo, Antonio Ortiz Lopez, Francisco J. Aranda Martínez y José A. Teruel Puche

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Molina de Segura

Los compuestos orgánicos de estaño, especialmente los trisustituidos como el tributilestaño (TBT), son ampliamente conocidos por ser contaminantes lipofílicos altamente tóxicos para el medio ambiente, debido a sus propiedades biocidas hacia una amplia gama de organismos.

Debido a estas actividades, es de gran interés profundizar en el mecanismo molecular de la interacción del TBT con los componentes de las membranas biológicas.

En este trabajo nos centramos en el efecto del TBT sobre las propiedades funcionales de una proteína de membrana como es la calcio ATPasa de retículo sarcoplásmico (RS), que retira 2 iones de calcio desde el citosol, al lumen del RS a expensas de la hidrólisis de 1 molécula de ATP.

Para caracterizar la acción del TBT sobre las propiedades funcionales de la proteína realizamos medidas de la actividad ATPasa y determinamos la unión de calcio al enzima, midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína.

Observamos que el TBT a concentraciones micromolares, produce la inhibición de la actividad ATPasa, mientras que la presencia de calcio en el medio protege totalmente al enzima frente a ésta inhibición en un rango de concentraciones similar a la unión de calcio al enzima. Del análisis cinético de los resultados experimentales concluimos que la unión del TBT compete con la unión del segundo calcio al enzima, pero no con la unión del primero, siendo todas las formas del enzima unido al inhibidor, formas inactivas. A partir de estas observaciones proponemos un mecanismo cinético para explicar todos los resultados experimentales.

Note: Subvencionado por el MCINN (Proyecto CTQ2007-66244 a A.O.).

P17r-17

The antimicrobial and cell agglutination activities of the eosinophil cationic protein depend on the lipopolysaccharide structure

David Pulido, Marc Torrent, Jose Antonio Blanco, Mohamed Moussaoui, Victoria Nogués y Ester Boix

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

We are working on the human Eosinophil Cationic Protein (ECP), an antimicrobial protein involved in host defense. ECP is highly cationic and its bactericidal activity is dependant on its membrane destabilization activity. Moreover, the protein presents a high affinity to lipopolysaccharides (LPS) and can specifically agglutinate gram –negative bacteria cells. We have identified a region at the N-terminus that can reproduce most of the protein activity, and partly retain the cell aggregation properties. To better understand ECP antimicrobial mechanism of action and in order to specifically evaluate the contribution of the LPS components on the protein antimicrobial properties, we have assayed a battery of *E. coli* K12 strain variants that present distinct chemotypes at the LPS core structure. The selected *E. coli* K12 mutants are defective in some of the genes involved in the LPS synthesis and present progressively truncated LPS molecules at their outer membrane. The so called “rough” bacteria mutants (Ra to Re chemotypes) provide a useful system to assess in situ the particular role of oligosaccharide and anionic LPS substituents. We have measured the ECP effect at both the outer envelope and cytoplasmic membrane level and assessed the changes on the bacteria cell viability. The bacteria cell agglutination activity and the outer envelope damage was further inspected by Scanning Electron Microscopy. Additionally, the protein bactericidal performance has been compared to ECP derived peptides. The data correlates the LPS structure with the bacteria viability and reveals the key contribution of electrostatic interactions between the cationic polypeptide and the anionic groups at the LPS inner core.

Note: Financiado por MICINN BFU2009-09371 y Generalitat de Catalunya 2009 SGR 795.

P17r-18

¿Cómo transmite la carbamil fosfato sintetasa 1 la señal alostérica a los centros activos?

Carmen Díez Fernández¹, Ana Isabel Martínez Pérez¹, Satu Pekkala¹, Belén Barcelona Andrés¹, Vicente Rubio Zamora² y Javier Cervera Miralles¹
¹Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia,
²Instituto de Biomedicina de Valencia/CSIC, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Valencia

La carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1) es un enzima multidominio que cataliza el primer paso del ciclo de la urea. Su déficit congénito produce hiperamonemia clínica.

La CPS1 es inactiva en ausencia de su activador alostérico esencial, el N-acetil-L-glutamato (NAG), y así el déficit de la NAG sintasa también provoca hiperamonemia. Sabemos dónde y cómo se une el NAG a la CPS1 (Pekkala *et al. Biochem J* 2009; 424 [2]: 11-220), pero no cómo produce esta activación extrema. De los 6 dominios de la CPS1, el NAG se une al C-terminal (20 kDa) o regulador, que está en contacto con los dos dominios catalíticos de 40 kDa. Exploramos mediante mutagénesis dirigida y mediante truncaciones C-terminales cómo se transmite la señal activadora del NAG desde dicho dominio alostérico a los catalíticos. Usamos como estructuras de referencia la de la CPS de *E. coli*, no activable por NAG, y la del dominio alostérico aislado de la CPS1 humana, que es muy similar a la del mismo dominio de *E. coli*. En el rastreo de posibles vías de transmisión de señales también explotamos el conocimiento de mutaciones clínicas. La α -hélice 4 del dominio regulador conforma en este dominio parte del sitio para NAG, y la α -hélice C-terminal debe proyectarse afuera desde este dominio, contactando con ambos dominios catalíticos. Probamos que esas dos hélices son elementos clave de la transmisión intramolecular de señales, así como residuos de las regiones 463-485 y 781-786 del dominio de fosforilación de bicarbonato, y 1318-1332 del dominio de fosforilación de carbamato, regiones esperadas de contacto con las hélices anteriores. De los otros tres dominios de la CPS1, los dos N-terminales podrían tener papel activador, no teniendo función asignada el restante.

Note: Ayudas GV AP049/2010 y MICINN SAF2010-17993.

P17-19

Molecular mechanisms for retinal diseases caused by mutations at Gly90 in the visual G protein coupled receptor rhodopsin

Eva Ramon¹, Darwin Toledo¹, Monica Aguilà¹, Arnau Cordomi², Hugo F. Mendes³, Michael E. Cheetman³ y Pere Garriga¹

¹Grup de Biotecnologia Molecular i Industrial, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa, ²Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ³Institute of Ophthalmology, University College of London, London (UK)

Two different mutations at Gly90 in the second transmembrane helix of the photoreceptor protein rhodopsin have been proposed to lead to different

phenotypes. G90D has been classically associated with congenital night blindness, whereas the newly reported G90V substitution was linked to retinitis pigmentosa. Here, we used Val/Asp replacements of the native Gly at position 90 to unravel the structure/function divergences caused by these mutations, and the potential molecular mechanisms of inherited retinal disease. The G90V and G90D mutants have a similar conformation of the 11-cis-retinal binding pocket, in the dark state, and same regeneration kinetics with 11-cis-retinal, but G90V has dramatically reduced thermal stability when compared to the G90D mutant rhodopsin. This thermal instability could be detected even in the dark at 20°C. The G90V mutant also shows, like G90D, an altered photobleaching pattern but similar capacity to activate the G protein, transducin than wild-type rhodopsin. Furthermore, the regeneration of the G90V mutant with 9-cis-retinal was improved, achieving the same A280/A500 as wild-type isorhodopsin. Hydroxylamine resistance was also recovered indicating a compact structure around the Schiff base linkage and the thermal stability substantially improved when compared to the 11-cis-regenerated mutant. These results support the role of thermal instability and/or abnormal photoproduct formation in eliciting a retinitis pigmentosa phenotype. The improved stability and more compact structure of the G90V mutant when it was regenerated with 9-cis-retinal brings about the possibility that this isomer -or other modified retinoid analogues- might be used in potential treatment strategies for mutants showing the same structural features.

P17r-20

Evaluation of 5 chemical compounds in *Podospora anserina*: cytotoxicity, effect on the aggregation of amyloid β peptide (1-42)

Laura Catalina López Rodríguez¹, Suzana Dos Reis², Marie-Lise Maddelein² y Javier Sancho Sanz¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse (France)

Alzheimer's disease is the most common cause of loss of cognitive function in older people. It is characterized by the presence of numerous senile plaques and neurofibrillary tangles and neuronal loss. The senile plaques are composed by amyloid beta peptide, which have between 39 and 43 residues [1,2,3].

Podospora anserina is a filamentous fungus used in several molecular genetics laboratories to study mycology and various aspects of fundamental cell biology.

At the Institut de pharmacologie et de biologie structurale in Toulouse, have different strains of this fungus, which express the amyloid beta peptide (1-42), being this an excellent model for evaluating compounds with pharmacological targets [4,5].

Evaluations were performed confocal fluorescence microscopy and Western blot assays to evaluate the toxicity and aggregation inhibitory capacity of 5 pre-selected compounds.

The 5 compounds showed cytotoxic average concentrations in the micromolar range. Two of the compounds showed an activity in the aggregation of amyloid beta peptide (1-42).

[1] Ray I., Chauhan A., Wegiel J., Chauhan V.P.S. *Brain Research* 2000; 853: 344-51.

[2] Szczepanik A.M., Rampe D., Ringheim G.E. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77: 304-17.

[3] Wiesehan K., Stöhr J., Nagel-Steger L., van Groen T., Riesner D., Willbold D. (2008) *Protein Engineering, Design & Selection* 2008; 21 (4): 241-46.

[4] Maddelein M.L. *Prion* 2007; 1 (1): 44-7.

[5] Maddelein M.L., Dos Reis S., Duvezin-Caubet S., Coulary-Salin B., Saupe S.J. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (11): 7402-7.

P17-21

Estabilidad termodinámica y dinámica evolutiva de citocromo b y COX I en mamíferos

Héctor Valverde Pareja y Juan Carlos Aledo Ramos

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga

La estabilidad estructural de una proteína es un factor determinante del patrón evolutivo de su correspondiente gen. En el presente estudio, hemos abordado la relación entre propiedades estructurales de dos proteínas codificadas por el genoma mitocondrial (citocromo b y COX I) y la dinámica evolutiva de sus genes. Para tal propósito, hemos analizado modelos estructurales de dichas proteínas y secuencias génicas en 231 especies de mamíferos. El interior de citocromo b (residuos que exponen menos de 5 % de su superficie al medio), en contraste con el interior de COX I, muestra una remarcable tolerancia a los cambios (sustitución de amino ácido). Esta mayor capacidad de cambio que muestra citocromo b, contrasta con una menor tasa de sustituciones sinónimas de su correspondiente gen, en comparación con el gen de COX I, sugiriendo que la

subunidad COX I está sujeta a una selección purificadora más fuerte. Presentamos evidencias de que el efecto de estabilidad de las mutaciones (DDG) pudiera ser responsable de este comportamiento diferencial entre citocromo b y COX I.

P17r-22

The emergence of antimicrobial peptide activity: A trade-off between charge and aggregation?

Marc Torrent Burgas¹, Javier Valle García¹, M. Victòria Nogués Vara², Ester Boix Borràs² y David Andreu Martínez¹

¹*Departamento de Ciencias Experimentales de la Salud. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona,*

²*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès*

Antimicrobial proteins and peptides (AMPs) are important effectors of the innate immune system that play a vital role in the prevention of infections and have been found to possess clinical potential in the treatment of bacterial infections. Notwithstanding, the origin and later development on the AMPs mechanism of action is not clearly understood up to date. Recent evidences point that some antimicrobial peptides have the capacity to aggregate upon binding to phospholipid membranes and bind amyloid diagnostic dyes. These findings suggest a possible relation between aggregation prone and antimicrobial active sequences. Here we suggest that antimicrobial peptides could arise, in the first evolution steps, from amyloid prone regions by a directed cationization process. By means of computational and statistic analysis we propose that AMPs may evolved by decreasing its aggregation propensity and increasing its charge. Based on the lysine distribution probability in antimicrobial peptides we have synthesized 24 new amyloid derived antimicrobial peptides (ADAPs). By these means, we demonstrate that it is possible to jump from amyloid prone regions, devoid of antimicrobial action, to antimicrobial peptides with potent activity. Additionally, most of the peptides characterized are able to adopt an alpha helical structure in a hydrophobic environment as 1:1 water:TFE, a widespread characteristic for many AMPs. We hypothesize that certain antimicrobial stretches in proteins and peptides could have emerged through cationization of amyloid prone regions. The results presented here open a window on both the search for new antimicrobial compounds and towards the understanding of the evolutionary success of these compounds.

P17r-23

Comunicación alostérica entre los dominios de unión a nucleótido de ClpB

José Ángel Fernández-Higuero¹, Garbiñe Celaya¹, Sergio P. Acebrón², Stefka G. Taneva¹, Urko del Castillo¹, Fernando Moro¹ y Arturo Muga¹

¹*Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EHU) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa,* ²*German Cancer Research Center (Division of Molecular Embryology), Heidelberg (Germany)*

ClpB es una chaperona homohexamérica que solubiliza y reactiva agregados proteicos en cooperación con el sistema DnaK/Hsp70. Cada monómero contiene dos dominios de unión a nucleótido (NBD), cuya actividad ATPasa tiene que estar acoplada para ejercer sobre el sustrato el trabajo mecánico necesario para extraer un monómero proteico y reactivarlo. Sin embargo, no se conoce cómo se comunican ambos sitios. Nuestro grupo ha estudiado la afinidad por nucleótido de diferentes variantes de ClpB en las que uno o ambos NBDs están mutados de forma que puedan unir nucleótido y no hidrolizarlo, o no puedan interactuar con el nucleótido. Los resultados demuestran que la afinidad del NBD2 por nucleótido ($K_d = 3-7 \mu\text{M}$) es significativamente mayor que la del NBD1. Además, la afinidad del NBD1 depende de la unión de nucleótido al NBD2. La unión de ATP, pero no de ADP, al NBD2 induce un aumento de la afinidad del NBD1 (la K_d disminuye de 160-300 a 50-60 μM) por dicho nucleótido. Esto indica que la comunicación alostérica entre los dos NBD distingue entre ATP y ADP. Además, el llenado del anillo NBD2 con ATP permite la unión cooperativa de este nucleótido y de sustratos al anillo NBD1. Los datos también sugieren que es necesario que cooperen al menos cuatros subunidades del hexámero para unir y reactivar agregados proteicos.

P17r-24

Descubriendo la función biológica de las CCP humanas, una nueva subfamilia de metalopeptidasas con potencial biomédico

Olivia Tort, Sebastián Tanco, Sebastián Alejandro Trejo, Francesc Xavier Avilés y Julia Lorenzo
Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB, Cerdanyola del Vallès

Las carboxipeptidasas citosólicas (CCP) forman una nueva subfamilia de metalopeptidasas con una localización

intracelular diversa. El miembro más estudiado de la subfamilia, la CCP1 o Nna1 (*nervous system nuclear protein induced by axotomy*), se sobreexpresa en situaciones de daño neuronal, mientras que el ratón mutante recesivo de *ccp1*, el ratón *pcd* (*Purkinje cell degeneration*) presenta degeneración de las células de Purkinje, además de degeneración de los fotorreceptores de la retina y de las neuronas mitrales del bulbo olfativo. Esto convierte a la CCP1 en una diana biomédica en procesos de neuroregeneración y neurodegeneración, pero en el genoma humano y de ratón existen 5 genes adicionales que codifican para proteínas con estructura similar a la CCP1.

La actividad biológica de los 6 miembros de la subfamilia está siendo caracterizada en nuestro grupo de investigación. Mediante técnicas de interactómica utilizando CCP recombinantes, se ha determinado como sustrato más probable los microtúbulos. Las CCP actuarían sobre las modificaciones postraduccionales (MPT) en los extremos carboxilo-terminales de las tubulinas cuando éstas están en forma polimerizada. Este fenómeno modificaría la afinidad por los microtúbulos de las proteínas asociadas a microtubulos (MAP) y de las proteínas encargadas del tráfico intracelular a través de las estructuras formadas por microtúbulos, un proceso clave para la supervivencia y ciclo celular, así como de especial relevancia en células neuronales.

P17-25

Reconstitución de bacterio-opsina mediante análogos merocianínicos del retinal

Guillem Marco García¹, Ana Cajaraville Leiro², Susana López Estévez² y Esteve Padrós Morell¹

¹Centre d'Estudis en Biofísica, Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela

La bacteriorodopsina (BR) es una proteína integral de membrana transportadora de protones dependiente de la luz, que se encuentra en la membrana de *Halobacterium salinarum*. En este proceso es clave el retinal unido covalentemente a la Lys216, ya que es la molécula que absorbe los fotones e inicia el fotociclo. Este retinal puede ser eliminado de forma sencilla de la proteína mediante reacción con hidroxilamina, dando lugar a bacterio-opsina (BO). La BR puede reconstituirse a partir de la BO añadiendo nuevamente retinal. En este trabajo se han usado cuatro nuevos derivados merocianínicos del retinal para analizar su capacidad para reconstituir la bacteriorodopsina. Este proceso se ha estudiado mediante espectroscopia de

UV-Vis, siguiendo el cambio en los espectros de absorción a lo largo del tiempo. Los resultados muestran que con los cuatro análogos usados, el pico de absorción máxima característico del análogo libre desaparece y en su lugar aparece otro pico en una longitud de onda mayor. Además, para estudiar la estabilidad de esta unión, se realizaron experimentos de competencia añadiendo retinal nativo a la preparación de BO-análogo y siguiendo los cambios en el espectro de absorción mediante espectroscopia de UV-Vis. En ningún caso se observaron cambios importantes del espectro inicial. En conclusión, los cuatro análogos merocianínicos son capaces de reconstituir la BR dando lugar a complejos BO-análogo del retinal con máximos de absorción característicos. Ello demuestra que los análogos ocupan el bolsillo del retinal, y que los complejos son suficientemente estables para que el retinal nativo no desplace a los análogos.

P17r-26

On the mechanism of pyridoxal 5'-phosphate transfer from pyridoxal kinase to serine hydroxymethyltransferase

Isabel Nogués¹, Rita Florio², Martin K. Safo³, Verne Schirch³, Martino Luigi di Salvo² y Roberto Contestabile²

¹Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, Centro Nazionale delle Ricerche, Roma (Italia),

²Dipartimento di Scienze Biochimiche and Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma, Roma (Italia), ³Department of Medicinal Chemistry and Institute for Structural Biology and Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA (USA)

The addition of cofactors to newly synthesized apo-proteins in the cell is a crucial event that can occur at different stages of polypeptide folding and affect it to a variable extent. Although much work has been done on the mechanism and structure of vitamin B6-dependent enzymes, little is known on how pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is supplied to the apoenzymes in order to meet their requirement in terms of cofactor. We decided to investigate the mechanism of transfer of PLP from the enzymes that catalyze its formation, *pyridoxine phosphate oxidase* and *pyridoxal kinase* (PLK), to the enzymes that use it as cofactor. As we approached this matter, we chose *Escherichia coli* as a model system. To start with, we decided to use *serine hydroxymethyltransferase* (SHMT) as PLP acceptor, since this is a well characterized fold type I B6 enzyme, and PLK as PLP donor. We observed that PLK is inhibited while it catalyzes the phosphorylation of

pyridoxal into pyridoxal 5'-phosphate using ATP. The enzyme is completely inhibited after about 40 catalytic cycles. However, if Apo-SHMT is added to the inhibited PLK, the inhibition is partially relieved. The inhibited PLK binds PLP very tightly and whereas the addition of PLP phosphatase to the PLK-PLP complex causes the hydrolysis of only half of the tightly bound PLP, the addition of apo-SHMT to the complex determines the complete transfer of the cofactor to SHMT. If PLP phosphatase is also present in the PLP transfer experiments, only a fraction of PLP is transferred to SHMT, while the rest of it, is hydrolyzed. We believe that these data do not support a channeling mechanism, rather they indicate that an interaction between PLK and SHMT determines the dissociation of PLP from the PLK-PLP complex and its following binding to SHMT.

P17-27

Expresión y caracterización de metalocarboxipeptidasas de origen bacteriano de la subfamilia M14D

Anabel Otero Bilbao, Mónica Rodríguez de la Vega Otazo, Sebastian M. Tanco, Julia Lorenzo Rivera, Francisc Xavier Avilés Puigvert y David Reverter Cendrós

Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB, Cerdanyola del Vallès

Las carboxipeptidasas (CP) están distribuidas en cinco reinos biológicos, catalizando la hidrólisis de los aminoácidos C-terminal de sus sustratos proteicos. Las más conocidas, variadas y canónicas pertenecen a la familia M14, con un átomo de cinc en el centro activo pentacoordinado con dos histidinas, un glutámico y una molécula de agua. Dicha familia se divide en tres subfamilias M14A, B y C. Recientemente nuestro grupo (Rodríguez de la Vega M. et al, 2007) describió una nueva subfamilia, la M14D o CCP (de *cytosolic CP*), a partir de la búsqueda de secuencias aminoácidas homólogas a la proteína Nna1, proteína relacionada con la regeneración de axones en ratón. En el reino Bacteria se identificaron cerca de cien organismos que contienen secuencias homólogas a Nna1/CCP. Las proteínas CCP en bacterias son pequeñas y presentan dominios N-terminal y CP conservados en la subfamilia. Hasta el momento se desconoce la función de estas proteínas en Bacteria. En humanos existen seis genes parálogos y se ha demostrado que algunos de ellos están relacionados con el procesamiento de modificaciones postraduccionales C-terminales de tubulinas. En este trabajo se han expresado de forma recombinante y purificado dos proteínas de la subfamilia M14D de origen bacteriano. Con el objetivo de caracterizar enzimáticamente ambas proteínas, se han realizado ensayos con sustratos

sintéticos y peptídicos con diferentes C-terminales; se ha estudiado la interacción con inhibidores conocidos de CP y se han realizado pruebas de procesamiento con diferentes proteasas. La caracterización estructural de ambas proteínas se está realizando mediante cristalografía de rayos X y otras estrategias de análisis estructural.

P17-28

LDL density determination by electric conductivity

José Carlos González Milicua¹, José Angel Fernández Higuero², Ana M^a Salvador Ibáñez³ y José Luis Rodríguez Arrondo⁴

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV-EHU), Leioa, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV-EHU); Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV-EHU), Leioa, ³Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV/EHU), Leioa, ⁴Unidad de Biofísica (CSIC/UPV-EHU) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa

Human serum lipoproteins are classified according to density interval: very low density lipoproteins (VLDL) have a density $<1.006\text{g ml}^{-1}$, low density lipoprotein (LDL) are in the interval of $1.006\text{-}1.063\text{g ml}^{-1}$, and high density lipoproteins (HDL) are in the interval of $1.063\text{-}1.21\text{g ml}^{-1}$ [1]. LDL has been described as a spherical particle containing a hydrophobic core of cholesterol esters and triglycerides surrounded by an amphipatic monolayer of phospholipids and cholesterol where the only protein component of LDL is a single molecule of apoB-100. ApoB-100 is a hydrophobic protein containing 4536 residues and with a molecular weight of 500kD [2]. Subfractions of LDL, characterized by variations in density, size, and chemical composition, are assuming important clinical significance; a predominance of small dense LDL particles is associated with an increased risk of coronary heart disease [3,4]. The aim of the present work is to develop a simple but precise method, based in electrical conductivity, to obtain density values in the LDL fraction divided in 3 subpopulations. Heterogeneity of LDL subfractions was corroborated by FTIR (structure) [5] and light-scattering analyses (size) [6].

[1] G.J. Nelson (ed.). *Blood Lipids and lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism*. New York: Wiley-Interscience, 1972.

[2] CY. Yang et al. *Nature* 1986; 323: 738-42.

[3] T.A. Musliner, R.M. Krauss. *Clin Chem* 1988; 34: B78-83.

- [4] M.A. Austin *et al.* *Circulation* 1990; 82: 495-506.
 [5] R.M. Krauss; D.J. Burke. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.
 [6] D. O'Neal *et al.* *J Lipid Res* 1998; 39: 2086-90.

P17r-29

Engineering oxidative stability in versatile peroxidase by directed evolution

David González-Pérez, Eva García-Ruiz, Alina Roman y Miguel Alcalde

Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC, Cantoblanco, Madrid

Versatile peroxidase (VP) produced by the white-rot fungi *Pleurotuseringii*, is a promising biocatalyst with high substrate promiscuity. This enzyme combines the structural features of manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP), showing three oxidation sites for high, medium and low redox potential substrates. Biotechnological applications of this enzyme are limited by its suicide inactivation mechanism produced at catalytic concentration of hydrogen peroxide. To overcome this hurdle, the VP has been subjected to a directed evolution program. The departure point for this study was the VP from *Pleurotuseringii* R4 mutant, which was previously engineered by directed evolution for functional expression in yeast [1]. A HTP-screening assay based on the tolerance to hydrogen peroxide was tuned and validated (CV below 13%). Libraries were constructed by mutagenic PCR adjusting the mutational rate to 1-2 mutations per whole gene. Two variants, 3B10 and 6H5 mutants showing 2.26- and 1.31-fold higher oxidative stability than parental type were preliminary characterized. Further research is ongoing using these two mutants as templates.

[1] E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, F.J. Ruiz-Dueñas, A.T. Martinez and M. Alcalde: Directed evolution of versatile peroxidases. *Submitted* (2011).

P17r-30

Estructura de un intermediario de plegamiento por análisis Φ de equilibrio: el glóbulo fundido de apoflavodoxina

Renzo Torreblanca Gonzales y Javier Sancho Sanz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, e Instituto de Biocomputación y Física de

Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza

El estudio de intermediarios parcialmente plegados de proteínas, es importante para entender el plegamiento y la dinámica de las proteínas. Nosotros hemos identificado que la apoflavodoxina de *Helicobacter pylori* (una proteína esencial para la supervivencia de esta bacteria) a pH 2.0 puebla un intermediario en equilibrio con propiedades espectroscópicas de un glóbulo fundido (GF) [1].

Hemos analizado la estructura de este intermediario por mutagénesis y análisis Φ de equilibrio [2] de residuos que establecen interacciones entre elementos de estructura secundaria en la proteína nativa, para obtener una estructura tridimensional a baja resolución del GF [3]. El análisis de nuestros datos indicaría que las interacciones nativas que están presentes en el GF, ya sea con intensidad natural o debilitadas, se encuentran fundamentalmente formando parte del empaquetamiento de las α -hélices; lo cual sugiere que algunas interacciones terciarias estarían presentes en el GF, o al menos en parte.

[1] Cremades N., M. Bueno, J. Neira, A. Velázquez-Campoy, J. Sancho (2008). *J Biol Chem* 2008; 283: 2883-95.

[2] Fersht A., A. Matouschek, L. Serrano. *J Mol Biol* 1992; 224: 771-82.

[3] Campos L., M. Bueno, J. López-Llano, M. Jiménez, J. Sancho (2004). *J Mol Biol* 2004; 344: 239-55.

P17-31

Análisis mediante mutagénesis dirigida de los cambios moleculares que ocurren durante la nucleación de fibras amiloideas

Lorena Varela, David Ruzafa, Ana Isabel Azuaga, Bertrand Morel y Francisco Conejero-Lara

Departamento de Química Física e Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada

La formación de fibras amiloideas está relacionada con enfermedades de enorme impacto social, tales como el Alzheimer, el Parkinson o la diabetes tipo II. Nuestros estudios previos han demostrado que el dominio SH3 de α -espectrina (SpC-SH3) puede formar rápidamente fibras amiloideas a pH moderadamente ácido [1]. Además, las condiciones en las que se produce la nucleación determinan fuertemente la cinética del proceso y la morfología final de las fibras [2].

En este trabajo se analizan los cambios moleculares del dominio SpC-SH3 durante el proceso de nucleación de las fibras mediante mutagénesis dirigida. Partiendo del mutante

amiloidogénico N47A, que sirve de referencia, se han realizado una serie de segundas mutaciones puntuales a lo largo de la cadena polipeptídica. Se han evaluado los cambios en la estabilidad de la proteína nativa mediante DSC y se han medido las velocidades iniciales de agregación de cada doble mutante mediante fluorescencia de tioflavina T (ThT) y dispersión dinámica de luz (DLS). Los resultados indican que la estabilidad del estado nativo no es crucial en el proceso de nucleación, ya que hay mutantes más estables que agregan más rápido y mutantes menos estables que agregan lentamente. El análisis cinético ha permitido profundizar en el mecanismo molecular del proceso de nucleación y elucidar qué regiones de la cadena polipeptídica juegan un papel clave en la transición conformacional entre el estado nativo y el estado amiloidogénico.

[1] Morel B., Casares S., Conejero-Lara F. *J Mol Biol* 2006; 356: 463-78.

[2] Morel B., Varela L., Azuaga A.I., Conejero-Lara F. *Biophys J* 2010; 99: 3801-10.

P17-32

Brucella abortus DRL X-ray crystal structure: insides into inhibitors specificities of the enzyme that catalyses the first committed step of the MEP pathway

Bárbara M. Calisto¹, Jordi Perez-Gil², Manuel Rodríguez-Concepción² y Ignacio Fita Rodríguez¹

¹Department of Structural Biology, Molecular Biology Institute of Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); Barcelona Science Park, Barcelona, ²Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics, CSIC, Barcelona

The synthesis of essential terpenoid natural products depends on two unrelated biosynthetic routes: the mevalonate (MVA) and the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathways. Surprisingly, the cattle pathogen *Brucella abortus* and some other bacteria, having only the MEP pathway, lack deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) reductoisomerase (DXR). DXR is, in plants and eubacteria, the only enzyme that catalyses the NADPH-dependent production of MEP from DXP. Recently, a protein (named DXR-like or DRL) was found in *B. abortus* that, despite having a very low sequence identity with DXR (below 15%), catalyzes also the first committed step of the MEP pathway.

We now report two X-ray crystal structures of the *B. abortus* DRL enzyme: the apo state and a complex with the

broad spectrum antibiotic fosmidomycin (FSM); solved to 1.5 and 1.8 Å resolution, respectively. The polypeptide folds into three distinct domains in resemblance to what was found for several bacterial DXR structures but reveal a different disposition of the domains and a C-terminal domain that is topologically very different from DXRs C-terminal domains, presenting an unsuspected structural similarity with antifreeze proteins. Analysis of the DRL active site show an unique arrangement, quite different from DXRs active site pockets, suggesting that the design of drugs that would selectively inhibit these two families of enzymes should be feasible.

P17r-33

Amyloidogenic peptides promote bacterial aging

Anna Villar-Piqué¹, Natalia S. de Groot¹, Raimon Sabaté¹, Xavier Fernandez-Busquets², Arturo Muga³ y Salvador Ventura¹

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Institute for Bioengineering of Catalonia and Barcelona Centre for International Health Research, Centre Esther Koplowitz, Barcelona, ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del País Vasco, Bilbao

The ability to aggregate into amyloid-like structures is not an exclusive property of the already discovered proteins associated to human disorders but rather a general characteristic of polypeptides. Accumulating theoretical evidences suggest that avoiding protein deposition acts as a strong selective pressure shaping protein sequences; structures and abundance in their natural environments and that deregulation of any of these three factors almost invariably result in protein aggregation. Unfortunately, solid direct experimental evidences demonstrating this relationship are still missing due to the difficulties to reproduce evolution conditions and time-scales in the lab. Our recent discovery that protein aggregation in bacteria structurally and mechanistically resembles that in higher organisms provides a mean to overpass these limitations using fast-growing, easily manipulable prokaryotic cells. Here we take a first step on such direction by demonstrating that the effect of amyloidogenic proteins in bacterial cell division and aging is modulated by their primary sequences and can be predicted ab-initio, providing thus a model system to study the effect of the protein quality machinery in deleterious amyloid aggregation reactions or to emulate how natural selection shape protein sequences according to their aggregation propensity under different evolutive pressures.

P17r-34

Caracterización por fluorescencia de complejos nucleoplasmina:histonas

Noelia Fernández Rivero, Isbaal Ramos Hernández, Arturo Muga Villate y Adelina Prado Ruiz

Unidad de Biofísica (CSIC – UPV/EHU) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU, Bilbao

La nucleoplasmina (Np) es una chaperona de histonas presente en oocitos (oNp) y huevos (eNp) de *Xenopus laevis*. La Np se fosforila durante el proceso de maduración del oocito, lo cual es fundamental para la actividad de la proteína. En el huevo Np está unida a dímeros H2A/H2B y su función principal es el remodelado de la cromatina espermática tras la fecundación.

Nuestro grupo ha caracterizado el complejo Np:H2A/H2B [1]. Además, hemos observado que, al igual que ocurre con otras chaperonas de histonas, la Np también forma in vitro complejos con los dímeros y tetrámeros H3/H4 y el octámero de histonas.

Nuestro objetivo es caracterizar el proceso de ensamblaje del nucleosoma mediado por la Np. Usando histonas recombinantes marcadas en posiciones concretas con distintos fluoróforos podemos medir la afinidad de Np con distinto grado de fosforilación por las histonas. De este modo podremos determinar el papel de los grupos fosfato en la actividad de la Np. Además, el marcaje de estas proteínas nos permitirá conocer si la Np es capaz de unir y ensamblar el octámero de histonas a partir de sus componentes, así como estudiar la interacción de los complejos Np:histonas con el DNA y la fibra de cromatina.

[1] Ramos I et al. *J Biol Chem* 2010; 285 (44): 33771-8.

P17-35

The NK1 receptor: strategies of expression, purification and refolding

Mikhail Orel, Esteve Padrós y Joan Manyosa
Centre d'Estudis en Biofísica, Unitat de Biofísica,
Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de
Barcelona, Bellaterra

Neurokinin-1 is a membrane receptor belonging to the family of GPCRs. Its activation by ligands (Substance P, NKA, NKB) is involved in many biological processes such as activation of the immune system, pain transmission or muscle contraction and vasodilatation. The NK1R structure as well as the mechanism of interaction with its ligands are not well understood until now. The main objective of this study is to express, purify and find the conditions for

refolding for human NK1 receptor expressed in *E. coli*.

The truncated 366 form of hNK1R was expressed in *E. coli* and the inclusion bodies were solubilized in 1% Lauroylsarcosine and then purified on a Nickel affinity column. The refolding of hNK1R was done by sequential washes with the refolding buffer supplied with 0.2% DDM, 1 mM GSH, 0.5 mM GSSG and 5 mM α -cyclodextrine.

The results of the radioligand binding show that the refolded hNK1R is active and can bind [³H]-Substance P. However, the refolding outcome should be quantified in order to determine the percentage of the active receptor in the sample. The intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy results show that at low concentrations of Gnd-Cl there is a blue shift in the emission spectrum peak that indicates changes of tryptophan to more hydrophobic environments as a result of protein folding. The shift becomes more evident if 0.1% DDM is added to the refolding buffer, indicating that the micellar structure of this non-ionic detergent stabilize the refolded receptor structure.

P17e-36

An allosteric modulator surface on the androgen receptor ligand binding domain

Víctor Buzón¹, Laia R. Carbó¹, Solène Grosdidier²,
Phuong Nguyen³, John D. Baxter³, Paul Webb³,
Juan Fernández-Recio² y Eva Estebáñez-Perpiñá¹

¹Institut de Biomedicina-Universitat de Barcelona (IBUB), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, ²LIFE Sciences Department, Barcelona Supercomputing Center (BSC), Barcelona, ³The Methodist Hospital Research Institute, Houston, TX (USA)

The Androgen Receptor (AR) is a ligand-activated transcription factor belonging to the steroid receptor family implicated in prostate cancer (PCa) and androgen insensitivity syndromes (AIS). It is a highly social modular protein and the ligand-binding domain (LBD) is its best-characterized domain. AR transcriptional activity can be modulated at 3 intervention sites in its LBD: the ligand-binding pocket (LBP), the coactivator-binding groove (AF-2 pocket) and the regulatory surface known as binding surface 3 (BF-3). Allosterity in AR has been basically ascribed to the conformational changes in the most C-terminal helix (H12) of the LBD coupled to hormone binding. Previous structural and functional studies, however, showed that allosterity in AR not only refers to H12 rearrangements but also to intra-molecular changes induced from BF-3 and transmitted to AF-2. The BF-3 region, although still a poorly characterized interface, may have functional consequences in AR under physiological

settings, as several mutations implicated in PCa and AIS cluster at this site and many BF-3 mutants result in enhanced AR AF-2 transcriptional activity. Furthermore, it is a hot spot for surface inhibitors, suggesting that BF-3 could be a *bona fide* protein-protein interaction surface. To further understand the role of BF-3 pocket as a regulator of AR function, we have combined functional *in vitro* assays with molecular dynamic (MD) simulations in order to investigate the effects of BF-3 mutations on AR LBD function and dynamics. Our data suggest that BF-3 conformation is indeed closely coupled to AF-2 and propose that BF-3 binds proteins that regulate AR AF-2 conformation and partner interactions.

P17-37

Hacia la comprensión del déficit de carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1) mediante estudios de expresión *in vitro*

M^a Pilar Albero Belda, Belén Barcelona Andrés y Javier Cervera Miralles

Reconocimiento Molecular. Centro Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia

El déficit de CPS1 (CPS1D), un error metabólico congénito del ciclo de la urea debido a mutaciones en el gen *CPS1* (2q35; 38 exones/37 intrones) cursa con hiperamonemia. Muchas de las mutaciones en este déficit son cambios de sentido cuyo potencial causal de la enfermedad no se ha determinado. Utilizamos un sistema de expresión de CPS1 humana recombinante basado en la infección de células de insecto con baculovirus para estudiar doce mutaciones de cambio de sentido en diez pacientes neonatales de CPS1D. La CPS1 es una enzima multidominio que tiene un requerimiento absoluto de N-acetilglutamato (NAG) para ser activo y que cataliza una reacción en tres etapas (2ATP + bicarbonato + amonio = 2 ADP + fosfato + carbamil fosfato) que inicia el ciclo de la urea. Las mutaciones afectan a siete residuos pertenecientes a los dos dominios catalíticos que son responsables cada uno de un paso de fosforilación (R587H, G593A, N716K, G982D/S, R1089C/L, H1195P, N1241K) y a dos residuos localizados en dos dominios de función desconocida (G79E y R850C/H). Las mutaciones reducen desde moderada a dramáticamente la síntesis de carbamil fosfato y afectan o no por igual o específicamente alguna de las dos reacciones parciales de la enzima que reflejan los dos pasos de fosforilación de la reacción CPS. La mutación G79E perturba la estabilidad de la enzima. El residuo R850, lejano al sitio de unión de NAG en el dominio regulador, parece mediar en la activación de la enzima por NAG. El sistema de preparación de CPS1 humana resulta válido para

probar la patogenicidad de las mutaciones. Se interpretan los efectos de las mutaciones a la luz de la estructura 3D de la CPS homóloga de *Escherichia coli*.

Nota: Ayudas: Generalitat Valenciana AP049/10 y MICINN SAF2010-17993.

P17-38

Estructura cristalina de dominios no colagenosos recombinantes de colágeno tipo IV como marco de referencia para entender los síndromes de Goodpasture y de Alport

Patricia Casino¹, Roberto Gozalbo Rovira², Jesús Rodríguez Díaz³, Javier Cervera², Vicente Rubio¹ y Alberto Marina¹

¹Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) y CIBERER, Valencia, ²Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, ³Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Paterna

La red de colágeno tipo IV (ColIV) de las membranas basales forma un andamiaje central en el que triples hélices de ColIV formadas por cadenas de colágeno α de varios tipos ($\alpha 1$ a $\alpha 6$) se conectan por ambos extremos. La conexión entre extremos C-terminales de dos trómeros es clave para formar la red, involucrando a los dominios globulares no colagenosos (NC) que forman el final de cada cadena α . Estas uniones son heterohexámeros de dominios NC, y tienen interés en patología porque se encuentra en ellas el autoantígeno que es la diana de los anticuerpos que producen el ataque a las membranas basales renal y pulmonar en el síndrome de Goodpasture (síndrome autoinmune raro mediado por anticuerpos). Además, en el síndrome de Alport (enfermedad renal genética) algunas mutaciones clínicas se han encontrado en dominios NC de cadenas α . El conocimiento estructural de los heterohexámeros del dominio NC se reducía hasta ahora a un sólo tipo, que no incluía el dominio diana de la enfermedad de Goodpasture. Hemos abordado la cristalización y determinación de la estructura cristalina de oligómeros formados por los dominios NC de las seis cadenas α producidas recombinantemente mediante un sistema de baculovirus/células de insecto, obteniendo estructuras de homohexámeros $\alpha 1_6$, $\alpha 3_6$ y $\alpha 5_6$, de heterohexámeros $\alpha 1_4\alpha 2_2$ y $\alpha 5_2\alpha 6_4$ y de monómeros $\alpha 4$. La ingente información estructural obtenida permite inferir cómo se organiza ColIV por su extremo C-terminal, en algunos casos contradiciendo propuestas de asociación

generalmente aceptadas, y crea un marco de conocimiento estructural en el que entender el síndrome de Goodpasture, y el de Alport cuando sus mutaciones afectan al dominio NC.

Nota: CIBERer, Fundación Ramón Areces, RGR beca FPU.

P17r-39

Caracterización de los aminoácidos localizados en el lazo inhibidor de la latexina

Carla Granados, Irantzu Pallares, Francesc Xavier Aviles y Josep Vendrell

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències i Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

La latexina es el único inhibidor endógeno conocido de metalocarbopetidasa (MCP), enzimas que catalizan la hidrólisis peptídica de residuos C-terminales. Estos enzimas están involucrados en importantes procesos celulares y se asocian con importantes enfermedades humanas (cáncer de páncreas, Alzheimer, diabetes tipo II, etc.).

Este inhibidor presenta una topología en dos subdominios equivalentes, el N-terminal (NTD) y el C-terminal (CTD), conectados a través de una hélice α . Su mecanismo de inhibición difiere del descrito para el resto de inhibidores de MCP ya que ninguno de sus extremos está involucrado en el proceso de inactivación del enzima.

En el presente trabajo se ha analizado el papel de los aminoácidos más relevantes del lazo inhibidor de la latexina mediante mutagénesis dirigida. Se evaluó el efecto de cada cambio mediante la comparación de las constantes de inhibición de las diferentes proteínas mutadas. La expresión de las proteínas recombinantes necesitó de la coexpresión de chaperonas moleculares con el objetivo de ayudar a su correcto plegamiento. Los análisis de la variante de la latexina sin el NTD indican que éste es indispensable para el correcto plegamiento del inhibidor, probablemente funcionando como un prosegmento que ayuda a que el CTD adquiera su estructura nativa, la pieza fundamental en la inhibición.

En conjunto, los resultados de estos estudios proporcionan información acerca de la naturaleza bi-modular de la latexina y de su mecanismo de inhibición, abriendo el camino a la posibilidad de obtener formas minimizadas del inhibidor con interés biomédico y biotecnológico.

P17-40

Efficient G-protein activation by fully-functional rhodopsin in the dark by the release of critical structural constraints

Eva Ramon Portés¹, Darwin Todelo González², Arfaxad Reyes Alcaraz¹, Margarita Morillo Cazorla¹ y Pere Garriga Solé¹

¹Grup Biotecnologia Molecular i Industrial, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa, ²Grup de Biotecnologia Molecular i Industrial, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa

Upon activation, G-protein coupled receptors bind and activate their specific heterotrimeric G-proteins. Binding of specific ligands promotes the transition from the inactive to the active receptor state enabling G-protein activation and signal transduction to occur. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors -referred to as ligand-independent G-protein activation- has been described as an important feature of the functioning of these receptors and has been associated to the pathophysiology of certain diseases. The retinal photoreceptor rhodopsin is the only case where the chromophoric ligand, 11-cis-retinal, is covalently bound through a Schiff Base linkage to the inactive ground-state of the receptor stabilizing it and acting as an inverse agonist. However, the dark state ligand-bound conformation of rhodopsin can become active by mutating specific amino acid residues. We report, here, on a fully-functional dark rhodopsin obtained by combining mutations at three of the well-known structural micro-switches governing dark ground-state conformational stability of the receptor. These are: T94I in the protonated Schiff base linkage environment (a mutation associated with the retinal condition congenital night blindness), M257Y located in TM6 and close to the rotamer toggle switch involving W265 in the retinal binding pocket (M257 comes to interact with Y306 of the NPxxY conserved sequence in TM7, upon rhodopsin activation) and E134Q in the ERY domain which is a main site of rhodopsin activity, participating in the so-called ionic lock of rhodopsin. The study of this triple mutant rhodopsin should provide new clues into the conformational flexibility of inactive-active conformations of rhodopsin and other G-protein-coupled receptors.

P17-41

Novel insights into galanin N-terminal fragment (1-15)-GalR1/GalR2 heteroreceptor interactions

Mercè Tena Campos¹, Dasiel Oscar Borroto-Escuela², Wilber Romero-Fernández², Orisley Franch de Armas², Juan Jesús Pérez³, Kjell Fuxe² y Pere Garriga Solé⁴

¹Grup de Biotecnologia Molecular i Industrial, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa, ²Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Sweden, Stockholm, ³Laboratori Enginyeria Molecular, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, ETSEIB, Barcelona, ⁴Grup de Biotecnologia Molecular e Industrial, Departament Enginyeria Química, Centre de Biotecnologia Molecular, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa

The neuropeptide galanin is a powerful modulator of classical neurotransmitters, widely distributed in the mammalian brain, which controls various processes such as nociception, learning, feeding, sexual behaviour, and others. The role of galanin can be exploited through its interaction with the three G-protein coupled receptor subtypes GalR1, GalR2 and GalR3. The N-terminal region of galanin comprises about 15 highly conserved amino acid residues, which act as the crucial region for agonist-receptor binding. To explore which amino acids or amino acid subset, within these 15 amino acids, are important for the recognition of the endogenous ligand, by the galanin receptor subtypes, we have used synthetic peptides with L-Ala substitution of individual amino acids, or blocks of amino acids, in the human galanin sequence and examined the binding, the efficiency and efficacy of signalling by either the mitogen-activated protein kinase (MAPK) or adenylyl cyclase (AC) pathways of these peptide analogues in transiently transfected HEK293T cells. Our results suggest that the galanin sequences (1-4) and (9-14) are essential for binding and functional coupling of galanin to all the three receptor subtypes, especially amino acid at position 9. The C-terminal amino acids (15-16) have little influence on the affinity of galanin for the receptor. However, this motif is important for the recognition by the GalR3 subtype, whereas amino acids in the middle portion of galanin (6-7) may play a role in functional coupling to GalR1/GalR2 but not to GalR3, and have no effect on the receptors' binding affinities. These findings suggest that different conformations of galanin are required for optimal recognition and efficient signalling by each receptor subtype.

P17-42

Producción, purificación y cristalización de Q88Y25_Lacpl una nueva carboxilesterasa de *Lactobacillus plantarum* WCFS1

María M. Esteban-Torres¹, Iván Acebrón², Blanca de las Rivas¹, Rosario Muñoz¹, Yanaisis Bárbara Álvarez Sánchez², José M. Mancheño² y Martín Martínez-Ripoll²

¹Instituto Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, Madrid, ²Instituto de Química Física Rocasolano. Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Madrid

La reciente secuenciación del genoma completo de la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [1], nos ha permitido observar la presencia en este microorganismo de diferentes familias de lipasas y carboxilesterasas. Uno de los objetivos que nos hemos planteado es la caracterización estructural de representantes característicos de todas estas familias. En este sentido, las proteínas Q88Y25_Lacpl y Q88YG9_Lacpl, formarían una familia de carboxilesterasas, claramente diferenciada, que muestra similitud de secuencia con la familia de lipasas sensibles a hormonas (Hormon Sensitive Lipases; HSL), concretamente, con la esterasa AFEST de la arquea *Archaeoglobus fulgidus* y con la esterasa hipertermofílica EstEI aislada de una librería metagenómica. El gen que codifica para Q88Y25_Lacpl se ha clonado y la proteína producida en *E. coli* BL21 (DE3). La producción de la esterasa claramente mejora cuando se co-expresa con el sistema GroES-GroEL. Q88Y25_Lacpl se ha purificado mediante dos pasos cromatográficos (TALON y Superdex 75) tal y como lo revelan los resultados de espectrometría de masas. Hemos conseguido preparar cristales de Q88Y25_Lacpl de alta calidad mediante experimentos de difusión de vapor en gota colgada, que han sido medidos en una fuente de radiación sincrotrón. Actualmente, estamos en proceso de determinación de la estructura de esta esterasa mediante la metodología MAD, preparando la proteína conteniendo Se-Met.

P17-43

Expresión y caracterización funcional de 6 variantes de la carboxipeptidasa Z humana

Javier García Pardo, Sebastián Tanco, Joan López Arolas, Francesc Xavier Avilés y Julia Lorenzo
Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB, Cerdanyola del Vallès

La carboxipeptidasa Z (CPZ) es una nueva carboxipeptidasa extracelular capaz de escindir residuos básicos C-terminales de péptidos y proteínas. Esta CP es la única de la familia que presenta un dominio *frizzled* o *Cysteine Rich Domain* (CRD) típico de los receptores del factor de crecimiento Wnt. Se desconoce la función que la CPZ pueda tener in vivo pero se piensa que podría participar en el procesamiento de diferentes neuropéptidos y factores de crecimiento que conservan Arg o Lys C-terminales modulando su actividad biológica. Esta proteasa es expresada en diferentes tejidos durante el desarrollo, y tiene su localización principal en la matriz extracelular (ECM). Experimentos funcionales y de interactómica con las Wnt sugieren un rol de la CPZ en estas vías de señalización. Para caracterizar la CPZ humana se clonaron y expresaron un total de 6 variantes recombinantes de las isoformas 1 y 2. En estas construcciones diferentes regiones del C-terminal de la proteína fueron deletionadas, con el fin de evaluar la posible función de esta región en la unión a la ECM. Se transfectaron en diferentes líneas celulares humanas y la localización subcelular de cada una de las variantes fue determinada por inmunocitoquímica y western-blot. La caracterización enzimática de las variantes se realizó por fluorimetría, dada la baja actividad específica del enzima. La inserción de 11 residuos en la región N-terminal en la isoforma 1 no tiene un efecto claro sobre la expresión y/o localización del enzima. Por el contrario la delección de diferentes segmentos C-terminales parece afectar la expresión y localización de la proteasa por lo que podrían estar implicadas en su procesamiento, interacción con otras proteínas o en la interacción con la propia matriz extracelular.

P17r-44

Versatilidad en los dominios lectina con estructura tipo β -trébol: Estudio detallado de interacciones con azúcar y aplicaciones biotecnológicas

Iván Acebrón¹, Blanca de las Rivas², Rosario Muñoz² y José Miguel Mancheño¹

¹Departamento de Cristalografía y Biología Estructural. Instituto de Química Física "Rocasolano", Madrid, ²Grupo de Biotecnología Bacteriana. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid

La estructura tridimensional de la proteína formadora de poros LSLa del hongo *Laetiporus sulphureus* ha permitido proponer la hipótesis de que el dominio lectina N-terminal (LSL150), con un plegamiento de tipo β -trébol, puede actuar in vivo como un solubilidad enhancer para el dominio

C-terminal, formador de poros en membranas. La verificación de esta hipótesis se ha llevado a cabo mediante la producción de diversas proteínas de fusión conteniendo LSL150 en la parte N-terminal. La sorprendente capacidad de este dominio para expresar y purificar las proteínas acompañantes ha permitido desarrollar aplicaciones biotecnológicas dirigidas a la producción-purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*, en las que LSL150 se emplea como fusión tag. Estos análisis sobre LSL150 junto con estudios cristalográficos a alta resolución de las interacciones con azúcares han servido de base para el diseño racional de mutantes con objetivo de producir una lectina con mayor afinidad por azúcares y, por otro lado, mejores propiedades biotecnológicas. También se ha llevado a cabo una búsqueda de proteínas homólogas a LSL150. Recientemente, tras la publicación del genoma del hongo *Laccaria bicolor*, se ha localizado una proteína de función desconocida (XP_001879265.1) que posee en su extremo N-terminal un fragmento que tiene un alto grado de identidad de secuencia. Esta proteína completa así como su módulo N-terminal se han producido recombinantemente. Por ahora, se ha resuelto la estructura cristalográfica a resolución atómica del módulo (LBL152). Esta estructura, que muestra el mismo plegamiento de tipo β -trébol que LSL150, proporciona información detallada de las interacciones que establece con los azúcares. Al igual que LSL150, LBL152 está siendo caracterizada como fusión tag.

P17e-45

Kinetic and structural determination of the selectivity of inhibitors against aldo-keto reductases AKR1B10 and AKR1B1

Joan Giménez¹, Xavier Ruiz², Sergio Porté¹, Jesús Ángel de la Fuente³, María Jesús Martín³, Jaume Farrés¹ y Xavier Parés¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ³Instituto Biomar SL, León

Two human enzymes from the AKR1B subfamily are of special interest: AKR1B1 is related to secondary diabetic complications, while AKR1B10 is induced in cancer cells. They share 71% amino acid sequence identity but show very different kinetic properties with some relevant substrates. These differences made it worthwhile to test whether the extensively studied AKR1B1 inhibitors have also an action on AKR1B10, with potential anticancer

applications. Previously, we analyzed a set of novel polyhalogenated compounds. Two of them, having an aryl portion linked to a core unit with a carboxylic acid, named JF0048 and JF0049, were the most potent and selective inhibitors against AKR1B1 and AKR1B10, respectively. Their molecular structures share the carboxylic acid group, while the aryl moiety provides selectivity for either target. In this work, we have determined the IC_{50} values against each enzyme with a set of JF0048/JF0049 derivative compounds. In good agreement with IC_{50} values, docking studies reveal that bulkier aryl moieties would favor selectivity for AKR1B10, likely due to a higher number of binding interactions than with AKR1B1. Furthermore, JF0038, where the carboxyl group of JF0049 is replaced by an ethyl ester group, displays an uncompetitive inhibition pattern, as it has been observed before for carboxylic acid-type of inhibitors binding to AKR1B1 and AKR1B10. In spite of similar inhibitory potency of the two compounds, the presence of an ester group in JF0038 could serve *in vivo* to facilitate its diffusion across cell membranes and, therefore, to improve its pharmacokinetic profile.

P17-46

Estudio de la unión de la proteína HMGA a través de sus secuencias específicas *AT-hooks* al DNA rico en AT

Elsa Fonfría-Subirós, Nuria Saperas, Marta Maturana, Francisco Acosta-Reyes, Raquel Sánchez-Giraldo, María del Carmen Navallas, Juan Antonio Subirana y J. Lourdes Campos López
Departament Enginyeria Química, ETSEIB, UPC, Barcelona

Las proteínas HMGA humanas son proteínas nucleares de alta movilidad electroforética y están presentes en todos los organismos eucariotas. Pertenecen a la familia de las IDP (*Intrinsically Disordered Proteins*), no presentan estructura secundaria ni terciaria definida y se caracterizan por tener 3 dominios de unión al DNA llamados *AT-hook* y una cola carboxi-terminal ácida. Mediante los dominios *AT-hook* se unen al DNA rico en AT, generalmente a través del surco estrecho. El *AT-hook* tiene una secuencia consenso (P)RGRP. Las proteínas HMGA participan en una gran variedad de procesos tales como desarrollo embrionario, reparación de DNA dañado, crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular. Además están asociadas a procesos patológicos, como diabetes, obesidad y a procesos tumorales, donde su sobreexpresión está relacionada con la malignidad y el potencial de formar metástasis del tumor. Para poder estudiar la estructura de la HMGA se han construido diferentes mutantes que tendrían los 3 *AT-hook*

sin la cola C-terminal, con dos y con un *AT-hook*. También se dispone de péptidos sintéticos que corresponden a cada uno de los 3 *AT-hook*. Se han realizado pruebas con geles de retardo para caracterizar la unión de las HMGA con diferentes oligonucleótidos ricos en AT, a diferentes concentraciones y condiciones. A partir de aquellas condiciones en las que se ha observado retardo (formación de complejo) se han realizado ensayos cristalográficos para poder obtener cocristales oligo-proteína. Asimismo se han realizado ensayos cristalográficos con péptidos sintéticos (correspondientes a cada uno de los 3 *AT-hook*) obteniéndose cristales, que han sido difractados en el sincrotrón de Grenoble. Tenemos datos preliminares de grupo espacial y parámetros de celda.

P17r-47

The novel alkenal/one reductase activity of human ζ -crystallin and its structural basis

Agriñ Moeini, Jaume Farrés, Xavier Parés y Sergio Porté

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Human ζ -crystallin is a Zn^{2+} -lacking medium-chain dehydrogenase/ reductase (MDR) included in the quinone oxidoreductase (QOR) family because of its activity with *ortho*-quinones. Recently we have characterized a novel enzymatic activity: the double bond α,β -hydrogenation of medium-chain 2-alkenals and 3-alkenones. The enzyme is especially active with lipid peroxidation products such as 4-hydroxyhexenal, and a role in their detoxification is proposed. This specificity is novel in the QOR family, and it is similar to that described in the distantly related alkenal/one reductase family (AOR). The structural analysis of the X-ray structure of human ζ -crystallin and the guinea-pig AOR, suggests a conservative role for a Tyr residue: Tyr53 in ζ -crystallin and Tyr245 in AOR. Docking simulations corroborates the role for Tyr53 and suggest the involvement of an additional Tyr residue, Tyr59, in catalysis. The kinetics of Tyr53Phe and Tyr59Phe mutants supports the implication of Tyr53 in binding/catalysis of alkenal/one substrates, while Tyr59 seems to be involved in the recognition of 4-OH-alkenals.

P17-48

The EAGR box: a *Mycoplasma* exclusive domain implicated in protein-protein interactions with components of mycoplasmas terminal organelle

Mercè Ratera¹, Barbara M. Calisto¹, Luca Martinelli¹, Alicia Broto², Jaume Piñol² y Ignasi Fita¹

¹Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Barcelona, ²Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

Mycoplasma genitalium is a motile, self-replicating human pathogen that often presents an asymmetrical pear-like shape due to a characteristic membrane protrusion composed by a complex cytoskeleton, the terminal organelle. This complex structure is considered to be the scaffold for mycoplasmas adherence to host cells and gliding motility. To date, up to 12 distinct proteins have been localized into the terminal organelle and interaction between them result in the formation of the supra-molecular structures observed in the mycoplasmas terminal organelles. A well conserved domain, Enriched in Aromatic and Glycine Residues (EAGR) box, is found in single or multiple copies in many proteins of the terminal organelle of motile mycoplasmas and there is no evidence for the presence of this domain in other prokaryotic or eukaryotic organisms. Cells bearing a deletion of the EAGR box in the terminal organelle cytoadherence-associated proteins MG312 and MG386 revealed that these mutant cells present severe mobile handicap. The EAGR box crystal structure solved to 2.9 Å resolution by the Single-wavelength Anomalous Dispersion (SAD) method of the *M. genitalium* MG200 protein revealed that the domain presents an essentially new fold with some peculiar features, such as its plasticity and the presence and organization of the intra- and inter-subunits symmetry axes which result in the unbalance of interactions, that suggest a role for the EAGR box in protein-protein interactions. In order to detect the expected interactions predicted to exist between EAGR boxes and other cytoadherence-associated proteins of the terminal organelle we have characterized possible binary complexes by NMR.

P17-49

Preliminary cristallization studies of tryparedoxin peroxidase TRYP6 from *Leishmania major*

Francisco Manuel González-Rico¹, Estela Pineda Molina¹, Gilda Esлами², Juan Manuel García-Ruiz¹ y Rasoul Salehi³

¹Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-Universidad de Granada), Granada,

²Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan (Iran), ³Department of Genetic and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan (Iran)

The parasite *Leishmania major* belonging to the order Kinetoplastida, causes a wide variety of life-threatening diseases. It posses the capacity to stand oxidative damage by highly reactive oxygen species (ROS) which is essential for the survival of these parasites in their host. In this context the tryparedoxin peroxidase protein family acts as a main antioxidant defense mechanism catalyzing the reduction of hydrogen peroxide into non oxidative products. For this reason tryparedoxin peroxidases have become an important drug target against *Leishmania*. To characterize its acting mechanism we focused our studies on the isolation, expression purification and structural characterization of one of the main peroxidases in *L. major* named Lm Tryp6. First attempts to obtain pure protein for crystallization trials produced protein solution with a high tendency to aggregation. Further experimental methods allowed to improve the protein purification protocol in such a grade we could get 11mg of protein with a high level of purity and homogeneity. First crystallization assays were performed into 0.1mm capillaries using the counter diffusion method as well as by the vapour diffusion technique at both 4° and 20°. Further screening allowed the formation of thin plates that grew as clusters as the first crystallization hit. Crystals have been tested for diffraction that was shown to be weak due to their small size. Crystal improvement in size and quality is ongoing in our laboratory.

The elucidation of Lm Tryp 6 structure will permit the design of efficient targets against this virulent parasite.

Note: Acknowledgements: Factoría Española de Cristalización. Consolider CSD- 2006-00015, MICINN-SPAIN. D. César Moyano (Grontal Soluciones Biotecnológicas S.L.).

P17-50

Folding and fibrillation of the C-terminal domain of histone H1 in the presence of detergents

A. Roque, N. Teruel, I. Ponte y P. Suau

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Biociencias. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra - Cerdanyola del Vallès

Histone H1 binds to the nucleosome and linker DNA in chromatin. The carboxy-terminal domain (CTD) of histone H1 has little structure in aqueous solution, but becomes extensively folded upon interaction with DNA. Histone H1 also performs functions outside cell nuclei, which may depend on its properties as a lipid-binding protein. We have shown by IR spectroscopy that neutral detergents, Brij 35 and Triton X-100, were able to induce the folding of the CTD with proportions of secondary structure similar to those observed in the DNA complexes. These results identify a folding pathway based on hydrophobic interactions and independent of charge compensation. The CTD is phosphorylated by cyclin-dependent kinases in a cell cycle dependent manner. The general effect of phosphorylation in the presence of detergents was a decrease in the amount of α -helix and an increase in that of β -structure. In SDS, which is capable of both hydrophobic and electrostatic interactions, the CTD became an all- β protein, and readily formed amyloid fibers.

P17-51

Amyloid fibrils of an FF domain

Virginia Castillo Cano, Alba Espargaró Colomé y Salvador Ventura Zamora

Grup de Plegament i Disseny de Proteïnes, Mòdul B del Parc de Recerca de la UAB (IBB), Barcelona

Protein aggregation underlies multiple of human disorders. Little is known about how globular proteins aggregate into toxic assemblies under physiological conditions. *In vitro* studies have shown that generally polypeptides might be partially or totally unstructured to aggregate, but recent studies have revealed that "native-like" conformations are able to self-assemble without need to unfold. Here, we have used the FF domain of the URN1 protein to study the structural properties of the amyloid-like aggregates, as well as conformational and stability studies of the initial species that promote aggregation.

P17-52

Contribution of disulfide bonds to stability, folding and amyloid fibril formation: the PI3-SH3 domain case

Ricardo Graña Montes¹, Natalia Sánchez de Groot¹, Virginia Castillo¹, Javier Sancho², Adrián Velázquez Campoy³ y Salvador Ventura¹

¹*Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona)*, ²*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza; Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems, Universidad de Zaragoza, and Unidad Asociada BIFI-IQFR, CSIC, Zaragoza*, ³*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza; Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems, Universidad de Zaragoza, and Unidad Asociada BIFI-IQFR, CSIC; Fundación ARAID, Diputación General de Aragón, Zaragoza*

The failure of proteins to fold or to remain folded very often leads to their deposition into amyloid fibrils and is the origin of a variety of human diseases. Accordingly, mutations that destabilize the native conformation are associated with pathological phenotypes in several protein models. Protein backbone cyclization by disulfide bond crosslinking strongly reduces the entropy of the unfolded state and, usually, increases protein stability. The effect of protein cyclization on the thermodynamic and kinetics of folding has been extensively studied, but little is known on its effect on aggregation reactions. The PI3-SH3 domain is a small globular protein, whose folding and amyloid properties are well characterized, providing thus a framework for the simultaneous study of the effect of cyclization on these processes. We show that a cyclised PI3-SH3 variant is more stable, folds faster, aggregates slower and forms conformationally and functionally different amyloid fibrils than the wild type. The present study demonstrates that disulfide bridges may act as key molecular determinants of both productive protein folding and deleterious aggregation reactions.

P17r-53

Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-Abeta impide la formación de fibras amiloides y la citotoxicidad del péptido Abeta mediante la retirada de oligómeros de la vía de amiloide

Marta Marín-Argany¹, Geovanny Rivera-Hernández¹, Joaquim Martí², Bernat Blasco-Moreno¹ y Sandra Villegas¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, ²Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

La inmunoterapia anti-Abeta se ha revelado como una herramienta esperanzadora en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La administración de fragmentos variables de cadena sencilla (*single-chain variable fragment*, scFv) no produce los efectos adversos observados en la administración de anticuerpos completos. Se presenta la expresión recombinante de scFv-h3D6, un derivado de un anticuerpo específico para beta-oligómeros, así como la demostración de su capacidad para anular la toxicidad inducida por el péptido Abeta1-42 en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para conocer los cambios conformacionales que subyacen a la prevención de dicha toxicidad se describe el espacio conformacional de scFv-h3D6 bajo perturbación por temperatura. El calentamiento del estado nativo no conduce a ningún grado de desplegamiento de la proteína, sino directamente a un estado intermedio estructurado que inicia una vía de agregación. Esta vía de agregación no es una vía amiloide, como la seguida por el péptido Abeta, sino más bien una vía en la que aparecen unas fibras curvadas que, notablemente, resultan ser no tóxicas. Por otro lado, esta vía se encuentra termodinámica y cinéticamente favorecida cuando el scFv-h3D6 y los oligómeros-Abeta1-42 forman un complejo en condiciones fisiológicas, lo que explica cómo el scFv-h3D6 retira al péptido Abeta de la vía de amiloide. A nuestro entender, esta es la primera descripción de un mecanismo molecular por el cual un scFv evita la toxicidad de los oligómeros formados por el péptido Abeta.

Nota: FIS-PI10-00975, FMM-2008, SGR2009-0761.

P17-54

Efecto de los lípidos en el proceso de amiloidogénesis de la insulina estudiado por 2DCOS

Nagore Andraka y José Luis Rodríguez Arrondo
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV-EHU); Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC -UPV-EHU), Leioa

El proceso de amiloidogénesis se produce tras un desequilibrio conformacional en la proteína que conlleva la formación de una estructura extendida, conocida como cross- β , con un espectro de infrarrojo característico. La existencia de proteínas, como la insulina, que aun no formando estructuras amiloides en condiciones fisiológicas son susceptibles de producirlas utilizando para ello pH y temperatura como factores desestabilizantes que desencadenen el proceso de agregación, permite el seguimiento del proceso de formación de la fibra. Las bicapas lipídicas son un posible desestabilizador en los procesos de amiloidogénesis, sirviendo como coadyuvantes, o como se ha sugerido, como chaperones negativos, en el proceso de desestabilización previo al de agregación. La espectroscopia 2DCOS, permite estudiar los cambios en el espectro de infrarrojo producidos por perturbaciones como las que se usan para inducir la amiloidogénesis. Se han medido mezclas lipídicas, solas y mezcladas con insulina a pD 2.0 a fin de ver la posible influencia del pH ácido en la formación de vesículas y fibras en nuestras condiciones.

P18. Señalización Celular

P18-1

Papel de los receptores A1 de adenosina en la modulación de la activación de los receptores de adenosina A2A en el estudio de las liberaciones espontáneas de calcio en cultivos de miocitos auriculares HL-1

N. Cabello¹, M. Barriga¹, G. Villela¹, C. Barrera², B. Ballester¹, A. Llach³, A. Ginell³, J. Cinca³ y L. Hove-Madsen¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Barcelona, Barcelona, ²Universidad de Barcelona, Barcelona, ³Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

Los receptores de adenosina A1 (A1R) y A2A (A2AR) se encuentran expresados en el corazón humano y ejercen efectos opuestos en los cambios del calcio intracelular en miocitos aislados. Sin embargo, no se conoce si existe una relación similar en preparaciones multicelulares, como la línea celular de miocitos auriculares murinos HL1. El objetivo de este estudio fue determinar si A1R y A2AR modulan las liberaciones de calcio latido-latido en cultivos de células HL1 sometidas a frecuencias de estimulación crecientes de la misma manera que en los miocitos humanos aislados. El estudio de expresión de A1R y A2AR en este cultivo celular mostró una relación entre ambos muy parecida a la existente en tejido humano. En cultivos de HL1, la activación de A2AR por su agonista específico incrementó la frecuencia de latido del cultivo. La adición del antagonista de A1R incrementó aún más esta frecuencia. En cultivos sometidos a estimulación eléctrica la fracción de respuestas irregulares, que aparecen a medida que sube la frecuencia de latido, aumentó de la misma manera tanto al activar A2AR con su agonista como al añadir el antagonista de A1R. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los receptores de adenosina A1 se encuentran activados a un nivel basal en miocitos auriculares murinos HL1 como ocurre en humano. Estos receptores de adenosina A1 además parecen modular los efectos de la activación de los receptores de adenosina A2A tanto en los cultivos HL1 con actividad contráctil espontánea como en los protocolos de estimulación de campo e inducción de respuestas irregulares. Así, los cultivos celulares HL1 se presentan como un modelo óptimo para el estudio *in vitro* de la señalización de receptores de adenosina en células cardíacas.

P18-2

Derivados de hispanolona suprimen la vía de señalización inflamatoria JAK-STAT en células de microglía estimuladas con IFN- γ

Florencia Cidre¹, Sandra Herranz¹, Beatriz de las Heras², Eva Cano³ y Sonsoles Hortelano¹

¹Unidad de Inflamación y Cáncer. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, ²Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, ³Unidad de Neuroinflamación. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid

La búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios derivados de productos naturales se ha incrementado enormemente en los últimos años. Recientemente hemos descrito que derivados de la hispanolona ejercen efectos antiinflamatorios en macrófagos peritoneales. Sin embargo,

no se conocen los efectos de estos compuestos en otros tipos celulares como la microglía. Así, en este trabajo hemos evaluado los efectos antiinflamatorios de los derivados de hispanolona en células BV2 y en cultivos primarios de microglía tras estimulación con IFN- γ . Nuestros datos muestran que los derivados de hispanolona son capaces de inhibir la liberación de NO, a nivel transcripcional. Utilizando técnicas de microarray y análisis de PCR cuantitativa comprobamos que también ejercen una clara inhibición de genes regulados por IFN- γ tales como las quimioquinas CXCL-10 (IP-10) y CXCL-9 (MIG). Estos efectos inhibitorios parecen estar mediados por la inhibición de la vía de señalización JAK-STAT.

P18r-3

El receptor D4 de dopamina, pero no la variante polimórfica D4.7 relacionada con el trastorno ADHD, forma heterómeros funcionales con el receptor D2 de dopamina en el cerebro

Sergio González González¹, Claudia Rangel-Barajas², Marcela Peper³, Ramiro Lorenzo³, Estefanía Moreno¹, Francisco Ciruela¹, Carme Lluís¹, Rafael Franco⁴, Peter McCormick¹, Nora Volkow⁵, Marcelo Rubinstein³, Benjamin Floran² y Sergio Ferré⁵

¹Universidad de Barcelona, Barcelona, ²Instituto Politécnico Nacional de México, México DF (México), ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires (Argentina), ⁴CIMA.

Universidad de Navarra, Pamplona, ⁵National Institute on Drug Abuse, Bethesda (USA)

Un gran número de estudios estadísticos de población relacionan consistentemente las variantes polimórficas del receptor D₄ de dopamina con el trastorno de hiperactividad y déficit de atención (ADHD). En especial, el polimorfismo D_{4.7} que se caracteriza por la presencia de 7 repeticiones en tándem de una secuencia aminoácídica en el tercer *loop* intracelular. En este trabajo demostramos como las variantes polimórficas más frecuentes D_{4.4} y D_{4.2} son capaces de formar heterómeros funcionales con el receptor D₂ de dopamina, pero en cambio, la variante polimórfica D_{4.7} no puede formarlos. A su vez, utilizando células cotransfectadas y cortes de estriado *ex-vivo*, demostramos como la activación del receptor D₂ potencia la señalización de las MAPK inducida por la activación de D_{4.2} o D_{4.4} cuando se forma el heterómero D₂-D₄; no observándose

esta potenciación en células transfectadas con D_{4,7} ni en cortes de estriado de ratones *knock-in* D_{4,7}. Por último, utilizando técnicas de microdiálisis y marcaje radioactivo, se demuestra como el heterómero D₂-D₄ juega un papel esencial de la modulación de la liberación de glutamato en el estriado, función que se relaciona directamente con el trastorno de hiperactividad y déficit de atención.

P18e-4

Another link between inflammation and cancer: secreted phospholipase A2 transactivates EGF receptor

Marita Hernández Garrido, Rubén Martín Montaña, Miriam García Cubillas, Patricia Maeso Hernández y María Luisa Nieto Callejo

Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid, CSIC, Valladolid

Secreted phospholipase A₂ group IIA (sPLA₂-IIA) is a molecule relevant in inflammatory events, proposed as a marker for some of these. We go deeper into the mechanisms that link this inflammatory protein with proliferation in one of the most aggressive types of tumors, astrocytoma. Phosphorylation of the extracellular regulated kinase (ERK) was preceded by the activation of the small GTPase Ras, and both failed to be activated by inhibiting protein kinase C (PKC). Fractionation and immunofluorescence studies revealed translocation of PKC alpha, delta, and epsilon to the membrane fraction. Immunoprecipitation analysis showed that sPLA₂-IIA induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) through a PKC-dependent pathway. Phosphorylation of this receptor contributed to Ras and ERK activation and that inhibition of ERK, PKC, and EGFR blocked the mitogenic response induced by sPLA₂-IIA. Therefore sPLA₂-IIA is able to bring into play EGFR to trigger its signaling and that PKC leads the distribution of resources. Interestingly, we found that this is not a cell-specific response, because sPLA₂-IIA was also able to transactivate EGFR in MCF7 human breast cancer cells. This mechanism could contribute to worsen the prognosis of a tumor in an inflammatory microenvironment.

P18r-5

Caracterización de la interacción de la quinasa humana VRK2 con la proteína Scaffold RACK1 (receptor for activated C kinase)

Diana M. Monsalve, Marta Sanz-García y Pedro A. Lazo

Centro de Investigación del Cáncer. CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca

VRK2 (*Vaccinia-related kinase-2*) es una serina-treonina quinasa de la cual existen dos isoformas (VRK2A y VRK2B) generadas por *splicing* alternativo del gen VRK2. VRK2A se encuentra distribuida en retículo endoplasmático y mitocondria, mientras VRK2B tiene localización nuclear y citoplasmática, ambas isoformas tienen la capacidad de fosforilar diferentes sustratos entre ellos el factor de transcripción p53. Mediante el análisis de espectrometría de masas se identificó la interacción de esta quinasa con la proteína *scaffold* RACK1. RACK1 (*receptor for activated C kinase*) es una proteína citosólica encargada de mediar interacciones proteína-proteína con el fin de establecer y amplificar una señal específica como respuesta a un determinado estímulo. Hemos observado que la estimulación con PMA incrementa la interacción entre ambas proteínas, pero la sustitución de las tirosinas 228 y 246 de RACK1 en su sexto dominio WD40, sitios importantes para la interacción con proteínas oncogénicas como Src, disminuyen drásticamente la interacción con VRK2A. A pesar de la función quinasa de la VRK2A esta no fosforila a RACK1 por lo tanto planteamos que la relación entre ambas proteínas es mediada solo por interacción. La interacción directa entre RACK1 y la tirosin-quinasa Src se ve afectada por la presencia de VRK2 y de manera similar observamos que la interacción entre RACK1 y VRK2A es afectada cuando Src está presente. En resultados pre-eliminarios hemos identificado la interacción entre Src y VRK2A. En base a estos resultados hipotetizamos que VRK2A y Src compiten por su unión a RACK1, lo que determina el balance final de activación de distintas rutas de señalización celular.

P18e-6

Papel de la chaperona Hsp90 y del oncogén Cdc37 en la translocación nuclear y actividad transcripcional de la MAP quinasa ERK5

Tatiana Erazo, Gerard Ruiz-Badot, Arantza Rodríguez-Asiain, José Aguilera, José Ramón Bayascas, Néstor Gómez y José Miguel Lizcano
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

ERK5 es una nueva MAP quinasa activada en respuesta a factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés, y que ha sido asociada con un mal pronóstico del cáncer de mama y próstata. Previamente, mediante Tandem Affinity Purification (TAP) identificamos por primera vez a ERK5 como una proteína cliente del Hsp90b, y que la inhibición farmacológica de este chaperón resulta en el mal plegamiento, la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5.

En este trabajo demostramos la existencia in vivo de un complejo trimérico ERK5-Hsp90b-Cdc37, y que tanto la inhibición farmacológica (Celastrol) como el *knockdown* del oncogén Cdc37 (siRNA) resulta en una drástica reducción de la expresión de ERK5. Mediante ensayos de actividad quinasa, fraccionamiento subcelular, microscopía de fluorescencia y *gene reporter luciferase* (AP-1) demostramos que la sobreexpresión de Cdc37 no tiene efectos sobre la actividad quinasa de ERK5, pero resulta en la translocación nuclear y en un aumento de su actividad transcripcional lo que demuestra por primera vez que la actividad transcripcional de ERK5 es independiente de su actividad quinasa. Por último, demostramos que tanto la activación por EGF, la sobreexpresión de la quinasa *upstream* constitutivamente activa MEK5 o la sobreexpresión de Cdc37, induce la disociación de Hsp90β del complejo trimérico y la translocación nuclear de ERK5 endógena, análogamente a lo descrito para los receptores de las hormonas esteroides. Nuestros resultados no sólo sugieren un nuevo mecanismo de translocación nuclear de una MAP quinasa, sino que también muestran una relación molecular y funcional de ERK5 con el oncogén Cdc37, lo que podría explicar el papel redundante de ambas proteínas en promover la proliferación e invasividad del cáncer de próstata y mama.

P18-7

Pho85 de *S. cerevisiae* controla la cantidad de Dma1

Natalia Ricco, Samuel Bru, Sara Hernández, Diana Toc, Sandra Menyo y Josep Clotet
Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès

Pho85 es una quinasa dependiente de ciclinas, presente en *S. cerevisiae*, que está implicada en un gran número de respuestas fisiológicas como por ejemplo las relativas al metabolismo de fosfatos y el control del ciclo celular. Resultados previos de nuestro grupo sugieren que el complejo Pho85/Pcl1 fosforila in vitro a la E3 ligasa Dma1. Dma1 tiene dominios proteínicos similares a los que se encuentran en la proteína Chfr de mamíferos, la cual juega un rol importante regulando la posición y orientación del huso, así como el depósito de septinas.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio demuestran que el complejo Pho85/Pcl1 fosforila a Dma1 recombinante en dos residuos específicos de Ser y Thr. Experimentos de coimmunoprecipitación sugieren que ambas proteínas están interaccionando in vivo. Además, también demostramos que células pho85D tienen menos cantidad de Dma1 comparadas con cepas wt, sugiriendo que Pho85 podría estar controlando los niveles de Dma1.

Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro modelo de trabajo propone que la relación entre estas dos proteínas podría tener consecuencias en la regulación de la entrada en la fase S.

P18r-8

Rac1 activation upon Wnt stimulation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin

Gabriela Valls Sierra¹, Montserrat Codina Pascual¹, Rachel K. Miller², Beatriz del Valle-Pérez¹, Antonio García de Herrerros³, Carme Caelles⁴ y Mireia Duñach⁵

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,*

²*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas M.D Anderson Cancer Center,*

³*Programa Recerca en Càncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona,*

⁴*Institut of Research in Biomedicine, IRB, Barcelona,*

⁵*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra*

The Wnt signaling pathway is essential for the correct embryo development and is involved in the control of cell growth and differentiation in most mammalian cells. Stimulation of β -catenin/Tcf-4 transcriptional complex is dependent on the stabilization of β -catenin, which occurs upon binding of extracellular Wnt ligands to the Wnt receptors. Recently, nuclear localization of β -catenin has been demonstrated to be dependent on Rac1 activity that induces the phosphorylation of β -catenin mediated by JNK2 kinase. These modifications are required for β -catenin nuclear accumulation. p120-catenin (p120) is a pleiotropic protein involved in E-cadherin stabilization. We have recently described that p120 also plays an essential role in the early responses to Wnt3a (Casagolda et al. JCS 2010, del Valle et al. MCB 2011). Moreover, Wnt3a promotes the CK1 ϵ -dependent phosphorylation of p120 decreasing its interaction with E-cadherin and releasing p120 from the receptor complex. This E-cadherin-unbound p120 pool participates in the stimulation of Rac1 activity. In our work we demonstrate that Rac1 is activated upon Wnt3a stimulation which temporally correlates with Rac1 and

Vav2 binding to p120. The directly interaction of Rac1 and Vav2 with p120 is differently affected by phosphorylation in the N-terminal domain of p120. When over-expressed, p120 mutants unable to bind Rac1 or Vav2 fail to stimulate Rac1 activity in these cells. We also show that in p120-depleted *Xenopus laevis* embryos, only p120 mutants able to bind Rac1 and Vav2 are effective in rescuing the wild-type gastrulation phenotype. Therefore, these results indicate that p120 is required for Rac1 activation upon Wnt signaling through its binding to Vav2 and Rac1 proteins.

P18-9

El lipopolisacárido de *E. coli* induce la activación del NF- κ B y la expresión de IL-6 y TNF- α en el intestino delgado de conejo

Laura Grasa, Ligia Verónica Hernández, Sergio Gonzalo, Marta Castro, Aurora Gimeno, Eva Latorre, Ana Isabel Alcalde, M^a Pilar Arruebo, Miguel Angel Plaza y M^a Divina Murillo
Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Introducción: El lipopolisacárido (LPS) induce estrés oxidativo e inhibe la contractilidad del intestino delgado de conejo, y en este efecto está implicado el NF- κ B. En este trabajo estudiamos: 1) la expresión y activación del NF- κ B y 2) la expresión del ARNm de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α en el intestino delgado de conejos tratados con LPS y varios inhibidores del NF- κ B.

Métodos: Los conejos fueron divididos en diferentes grupos y se les administró (1) solución salina (control), (2) LPS, (3) Pirrolidinditiocarbamato de amonio (PDTC), (4) Sulfasalazina, (5) RO 106-9920, (6) PDTC + LPS, (7) Sulfasalazina + LPS y (8) RO 106-9920 + LPS.

Mediante western blotting se determinó la expresión del NF- κ B en extractos nucleares de la capa muscular del duodeno. Se utilizó el Multiplex Transcription Factor Profiling kit (Marligen, USA) para determinar la unión del NF- κ B al ADN. La expresión del ARNm de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α se analizó mediante RT-PCR.

Resultados: En la capa muscular del duodeno de conejos tratados con LPS se detectó mediante western blotting una banda de 65 kDa, correspondiente al NF- κ B, que no se detectó en los conejos control. Además en los conejos tratados con LPS se detectaron unos niveles de unión del NF- κ B al ADN superiores a los de los controles. Los inhibidores del NF- κ B, PDTC, sulfasalazina y RO 106-9920, bloquearon la activación, translocación y unión al ADN del NF- κ B.

El LPS incrementó la expresión de IL-6 y TNF- α , pero no de IL-1 β , IL-8 o IL-10 en la capa muscular del duodeno.

Sólo la sulfasalazina pudo revertir este efecto del LPS.

Conclusión: El LPS induce la activación, la translocación al núcleo y la unión al ADN del factor NF- κ B, así como la expresión de IL-6 y TNF- α , en la capa muscular del duodeno de conejos. Los inhibidores del NF- κ B, PDTC, sulfasalazina y RO 106-9920, revirtieron estos efectos.

Nota: Financiado por DGI (AGL2006-04317) y B61/2010. L.V. Hernández, A. Gimeno y E. Latorre tienen una beca personal (MAEC-AECID 0000446822, B090/09 y B105/11).

P18-10

La fosfatasa DUSP1 inhibe la señalización dependiente de NF- κ B y regula la proliferación y la apoptosis en células de cáncer de próstata DU145

Beatriz Gil-Araujo, Julia G. Pitalúa y Marina Lasa
Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UAM-CSIC, Madrid

Una de las proteínas que parece jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de próstata es la fosfatasa de doble especificidad 1 (DUSP1), ya que su expresión se encuentra disminuida en los tumores de estadio más avanzado. Otro de los determinantes en dicho proceso es la existencia de una hiperactivación del factor de transcripción NF- κ B, lo que conlleva a la desregulación de la transcripción de genes implicados en supervivencia y apoptosis celular. Puesto que nuestro grupo y otros investigadores hemos demostrado previamente que DUSP1 es capaz de regular la vía de señalización mediada por NF- κ B en distintos sistemas celulares, en este trabajo hemos estudiado el efecto de DUSP1 sobre la cascada de señales de NF- κ B y sobre la proliferación y apoptosis de las células de cáncer de próstata DU145. Nuestros datos indican que la sobreexpresión de DUSP1 inhibe la transcripción dependiente de NF- κ B, la translocación de p65/NF- κ B al núcleo, así como su capacidad de transactivación. Paralelamente, hemos observado que dicha fosfatasa induce, por una parte, una bajada de la tasa de proliferación de dichas células y, por otra parte, un aumento significativo de la apoptosis celular. Además, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de DUSP1 tiene los mismos efectos sobre la señalización mediada por NF- κ B y la proliferación en las células de cáncer de próstata PC3, pero no en otro tipo celular de cáncer de próstata, las células LnCap, lo que indica que el efecto de DUSP1 es dependiente de tipo celular. Todos los resultados obtenidos sugieren que la fosfatasa DUSP1 inhibe la proliferación e induce la

apoptosis de células DU145 a través de un mecanismo dependiente de la cascada de señales dependiente de NF-kB.

P18-11

Ceramide 1-phosphate-stimulated macrophage proliferation requires ROS production

Lide Arana Urbietta, Alberto Ouro, Patricia Gangoiti, Miguel Trueba y Antonio Gómez-Muñoz
Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (EHU-UPV), Leioa

Ceramide 1-phosphate (C1P) is mitogenic and antiapoptotic for macrophages. We have previously defined some of the pathways involved in these actions, including mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellularly regulated kinases (ERK1-2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB, or Akt), c-Jun N terminal kinase (JNK), and protein kinase C- α . We now show that production of reactive oxygen species (ROS) is a major mechanism by which C1P stimulates cell growth. ROS generation was dependent upon NADPH oxidase activation. Blockade of this enzyme activity with selective inhibitors abrogated ROS production and macrophage growth, suggesting that the axis NADPH oxidase/ROS is essential for the mitogenic effect of C1P. Moreover, we observed that NADPH oxidase can be blocked by protein kinase C (PKC) or cytosolic phospholipase A2 inhibitors thereby implicating these two enzymes in the mechanism whereby C1P stimulates NADPH oxidase. In conclusion, we demonstrate that activation of NADPH oxidase and the subsequent generation of ROS are essential processes required for the mitogenic effect of C1P.

Note: This work was supported by grants BFU2009-13314 from "Ministerio de Ciencia e Innovación" (Madrid, Spain) and SA-2010/00013 from the "Departamento de Industria, Innovación, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco" (Basque Country, Spain).

P18-12

Interacciones entre las rutas de p38 α MAPK y C3G en la regulación de la adhesión, migración e invasión celular

María Archederra¹, Neibla Priego¹, Ana Vázquez-Carballo¹, Alvaro Gutiérrez-Uzquiza¹, Paloma Bragado¹, Carmen Guerrero² y Almudena Porras¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid,* ²*Centro de Investigación del Cáncer. CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca*

La p38 α MAPK es la isoforma más abundante de las p38 MAPK y la más ubicua, siendo esencial para el desarrollo embrionario. Regula múltiples funciones celulares, incluida la adhesión y migración. C3G es una proteína activadora del intercambio de nucleótidos de guanina de miembros de la familia de GTPasas Ras y Rho, siendo Rap-1 su principal diana. También regula diversas funciones celulares, entre las que se encuentran la adhesión y migración. Recientemente, nuestro grupo ha descrito una relación funcional entre C3G y p38 α , de tal forma que C3G a través de la regulación negativa de la actividad de p38 α puede inducir apoptosis o supervivencia. En base a ello, hemos analizado si C3G y p38 α MAPK pueden actuar también en rutas comunes para modular la adhesión, migración e invasión celular en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y si C3G actúa a través de Rap-1. También, hemos explorado qué ocurre con esta ruta en modelos de células tumorales. Nuestros datos indican que las células de fenotipo silvestre presentan una mayor capacidad migratoria que las deficientes en p38 α y el silenciamiento génico de C3G produce un aumento en la velocidad de migración solo en las células que expresan p38 α . Por tanto, la hiperactivación de p38 α inducida por silenciamiento de C3G mediaría este aumento de la capacidad migratoria. Por otro lado, p38 α regula negativamente la adhesión celular, mientras que C3G favorecería este proceso y/o la extensión celular probablemente a través de su efector Rap-1 o de otras rutas independientes de p38 α , dado que el silenciamiento de C3G tiene el mismo efecto en MEF con o sin p38 α . Además, resultados preliminares sugieren que, en presencia de suero, la deficiencia de p38 α promueve la invasión a través de matrigel en MEF no transformados.

P18-13

Nuevos sustratos de la E3 ubiquitín ligasa SKP1-CUL1-FBW7

Servando Giráldez¹, Joaquín Herrero-Ruiz¹, M. Cristina Limón-Mortés¹, Mar Mora-Santos¹, Miguel A. Japón², María Tortolero¹ y Francisco Romero¹

¹*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla,* ²*Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla*

El sistema de proteólisis dependiente de ubiquitina-proteasoma constituye un mecanismo de regulación de los procesos celulares muy rápido y específico. La degradación

por ubiquitinación de sustratos clave controla la progresión del ciclo celular, la transducción de las señales o la reparación del ADN, entre otros. Este proceso comprende dos etapas: la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina a los sustratos, mediante la intervención de las enzimas E1, E2 y E3, y la degradación de las proteínas poliubiquitinadas por el complejo 26S del proteasoma. El componente E3, (ubiquitin ligasa) parece ser el responsable primordial del reconocimiento específico de los sustratos a ubiquitar. En concreto, en el caso de la ubiquitin ligasa SKP1-CUL1-F-box, la molécula con la que interaccionan los sustratos es una de las muchas proteínas F-box identificadas, tres de las cuales, β TrCP, FBW7 y SKP2, están bien caracterizadas y controlan muchas proteínas asociadas al cáncer. La F-box FBW7 es un supresor tumoral. Esta F-box reconoce una serie de oncoproteínas, entre ellas la ciclina E, MYC, JUN, Notch1 y Notch4. Se han encontrado mutaciones en el gen FBW7 en cáncer de ovario, pulmón, linfomas y colon. A partir de ratones mutantes en uno de los dos alelos del gen Fbw7 se ha comprobado que es un supresor tumoral haploinsuficiente, siendo estos ratones más sensibles que los silvestres a la inducción de tumores tras radiación. El mecanismo de tumorigénesis en estos ratones mutantes parece ser la acumulación de una serie de sustratos de esta F-box. En este trabajo presentaremos los resultados obtenidos utilizando el sistema del doble híbrido en levaduras y experimentos de coimmunoprecipitación y espectrometría de masas para identificar nuevas proteínas que interaccionen con FBW7.

P18-14

The role of PDK1 beyond Akt in the central nervous system analysed by knock-in mutation

Tinatín Zurashvili, Lluís Cordon-Barris y José Ramón Bayascas

Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

The phosphoinositide 3-kinase signalling pathway governs many of the actions of neurotrophic factors, neurotransmitters and hormones and thereby plays a central role in promoting neuronal survival, morphogenesis and plasticity. PDK1 is a crucial master kinase that, in response to PI 3-kinase activation, switches on a number of AGC-kinase family members including PKB/Akt. Activation of Akt by PDK1 relies on the interaction of the PH domains present on both kinases with PtdIns(3,4,5)P₃, the PI 3-kinase product. By contrast, in order to activate the rest of targets including S6K, RSK and SGK isoforms, PDK1 interacts with a phosphorylated docking site on those

substrates by means of the PIF-pocket. To dissect the contribution of the different PDK1 down stream targets to PI 3-kinase actions in the central nervous system, we employed two knock-in mice strains expressing two specific single aminoacid mutations of PDK1. The PDK1 K465E impairing the binding of the PDK1 PH domain to PtdIns(3,4,5)P₃, and the PDK1 L155E that disrupts the PDK1 PIF-pocket. Activation of Akt by BDNF is severely impaired in primary cortical neurons derived from PDK1 K465E embryos, whereas activation of other PDK1 targets proceeds normally. By contrast, activation of PKB by BDNF reached normal levels in the PDK1 L155E primary neurons, while activation of S6K, RSK and SGK is totally abolished. The ability of BDNF to both support cell viability and promote neurogenesis of those mutant primary cultures has been also investigated, and the contribution of the two major PDK1 signalling branches to neuronal survival and differentiation defined.

Note: Funded by: Instituto de Salud Carlos III, Acción Estratégica en Salud, PI10/00333

P18r-15

Caracterización de la unión de las *brain specific kinases* 1 y 2 (SAD kinases) al galactocerebrósido sulfátido: modulación de la actividad quinasa

Gerard Ruiz Babot, Arantza Rodriguez-Asiain, Tatiana Erazo Andrade, José Aguilera, Néstor Gómez Trias, Enrique Claro y José Miguel Lizcano
Institut de Neurociències & Departament de Bioquímica i Biologia Molecular Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

Las *brain specific kinases* (BRSK 1 y 2) son Ser/Thr quinasas que se expresan en cerebro y son activadas por fosforilación directa por LKB1. La vía LKB1-BRSK juega un papel primordial en la polarización neuronal, y las neuronas corticales del ratón KO BRSK1/2 o del ratón condicional LKB1 KO carecen de axón. Además, un *pool* de BRSK1 (pero no BRSK2) localiza en las vesículas de la terminal presináptica, donde controlaría la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, no se han descrito los mecanismos que modulan la actividad de las BRSK in vivo, ni cuáles son sus sustratos.

Mediante fraccionamiento subcelular hemos observado que una fracción de BRSK1/2 neuronal localiza en la fracción de membrana. Sin embargo, el análisis *in silico* detallado utilizando diferentes algoritmos revela la ausencia de hélices- α transmembrana o de dominios de unión a lípidos que expliquen su presencia en la fracción particulada.

Mediante ensayos de *lipid-protein overlay* y de unión a liposomas hemos determinado que BRSK1 y 2 unen el galactocerebrósido sulfátido, pero no otros lípidos de membrana. El sulfátido (3-sulfogalactosilceramida) es un lípido cargado negativamente presente en la mielina y en las membranas intracelulares de neuronas y astrocitos. La unión BRSK-sulfátido es específica, no dándose en otras quinasas de la familia (como MARK4), y modula *in vitro* la actividad quinasa de BRSK1, induciendo una activación del 300% a concentraciones 0.1-1 μ M. Por último, mediante la obtención de mutantes de delección, hemos identificado la región en las BRSK (de unos 50 aa) de unión al sulfátido. A falta de los correspondientes estudios estructurales, esta región podría suponer un nuevo dominio de unión a lípidos cargados negativamente que modularía la actividad quinasa de las BRSK.

P18-16

Nuclear receptors FXR and TR regulate the tumor suppressor gene N-Myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) via overlapping elements

Cédric Langhi, Elena Pedraz y Joan Carles Rodríguez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

NDRG2 has been established as a tumor suppressor gene and its expression is altered in a variety of cancers, and modulation of its expression affects key hallmarks of carcinogenesis such as cell proliferation, differentiation, migration, invasion and stress response. The Farnesoid X Receptor (FXR) and Thyroid Hormone Receptors (TRs) have been proposed as protectors against hepatocarcinoma. However, molecular mechanisms by which these nuclear receptors (NRs) exert their effects remain poorly understood.

Here we show that NDRG2 mRNA and protein levels were induced in human hepatoma cells and in human primary hepatocytes by natural (chenodeoxycholic acid) or synthetic FXR ligands, as well as adenovirus-mediated overexpression of a constitutively active form of FXR. The specificity of FXR to mediate the regulation of NDRG2 expression was demonstrated *in vitro* by the use of siRNA and *in vivo* by the treatment of FXR deficient mice. NDRG2 mRNA and protein were also induced by T3 treatment in mouse immortalized hepatocytes AML12 and mouse primary hepatocytes. In mice, NDRG2 hepatic expression was reduced by PTU-induced hypothyroidism, whereas it is induced by T3 treatment. Transient transfection and site-directed mutagenesis analysis demonstrated that FXR and TR induced NDRG2 gene

through overlapping IR1 and DR4 elements, respectively. Accordingly, the mutation of the common hexamer abolished the response to both NRs.

In conclusion, our data demonstrate that the anti-tumorigenic gene NDRG2 is a direct target of FXR and TRs. These results highlight a novel mechanism whereby these NRs may protect in cancer.

P18e-17

The interaction between the docking/scaffold proteins Sprouty2 and Sur8 in the regulation of Ras/Raf/MEK/ERK pathway

Lara María Durá, Gonzalo León, José Luis Oliva, Judith Castro y José María Rojas

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda

Ras/Raf/MEK/ERK pathway deregulation is implicated in a wide variety of human pathologies including cancer. Several docking proteins act at different levels of this pathway modulating the cell response. Protein members of the Sprouty family are negative regulators of RTK signaling while in contrast Sur8 protein is a positive regulator of this cascade. Despite the importance of their correct working in maintaining the balance in proliferation, survival or apoptosis, the mechanism of action by which these scaffold proteins regulate the Ras/Raf/MEK/ERK pathway has not been fully clarified. In this study, we have identified an interaction between Sprouty2 and Sur8. This interaction is enhanced in absence of growth factors cell stimulation. Additionally, we show that this interaction is increased when the Sur8E457K mutant, unable to stimulate ERK activation, is expressed. Interestingly, the interaction is weak with the Sur8Y523F mutant and is blocked with a Sur8 mutant unable of binding Ras protein (Sur8C260Y). Immunofluorescence assays indicate that the interaction Sprouty2/Sur8 is localized in vesicular structures uncharacterized. Finally, we have found that overexpression of Sur8 overcomes the inhibitory effects of Sprouty2 in ERK activation. In conclusion, our results suggest that the ability of Sur8 to act as a positive regulator of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is influenced by the interaction with Sprouty2 by blocking the Ras binding site.

P18-18

The role of Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress

Antonio Casamayor, Amparo Ruiz, Raquel Serrano, María Platara, Jofre Ferrer-Dalmau y Joaquín Ariño

Institut de Biotecnologia i Biomedicina and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

Alkaline pH stress invokes in *S. cerevisiae* a potent and fast transcriptional response that includes many genes repressed by glucose. Certain mutants in the glucose-sensing and response pathways, such as those lacking the Snf1 kinase, are sensitive to alkalinisation. The *snf1* alkali-sensitive phenotype is fully abolished by increasing glucose concentration in the medium. Snf1 mediates, in full or in part, the activation of a significant subset (31%) of short-term alkali-induced genes, including those coding high-affinity hexose transporters and phosphorylating enzymes. Remarkably, cells lacking Reg1, a regulatory subunit of Glc7 required for targeting to Snf1, are strongly alkali-sensitive but this phenotype is not fully abolished by increasing glucose in the medium. A screen for high-copy gene number suppressors of the alkali-sensitive *reg1* phenotype yielded Reg1-related (*REG2* and *YKR075c*), as well as several cell cycle-related genes. The addition of micromolar amounts of iron and copper to a glucose-supplemented medium resulted in an additive effect, leading to near-wild type growth at high pH, thus suggesting that these nutrients are the major limiting factors for growth of budding yeast in an alkaline environment.

Sam68, miembro de la familia STAR de proteínas de unión al ARN, se ha relacionado con diferentes sistemas de señalización, como el receptor de leptina (LEPR), donde actuaría como molécula adaptadora. La activación de LEPR estimula las vías de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K mediando los efectos biológicos de la leptina, como ocurre en células trofoblásticas. Se ha visto previamente que la estimulación con leptina también promueve la sobreexpresión y la Tyr-fosforilación de Sam68 en células trofoblásticas JEG-3, sugiriendo un papel para Sam68 en las principales rutas de señalización activadas por LEPR para incrementar el crecimiento y proliferación de estas células.

Metodología: Inhibimos la expresión de Sam68 en células JEG-3 y estudiamos la señalización de LEPR mediante inmunoprecipitación, precipitación por afinidad a poliU y analizando los niveles de fosforilación de las proteínas de señalización por inmunoblot. El efecto de la leptina sobre la síntesis proteica y proliferación se estudió mediante incorporación de 3[H]-leucina y 3[H]-timidina.

Resultados: La inhibición de la expresión de Sam68 disminuyó la activación mediada por leptina de las vías de señalización JAK-STAT, PI3K y MAPK en JEG-3. Además, la Tyr-fosforilación de Sam68 mediada por leptina fue dependiente de la actividad JAK-2, ya que el inhibidor farmacológico AG490 disminuyó la fosforilación de Sam68 en estas células. Finalmente, el efecto trófico y proliferativo de la leptina en células trofoblásticas depende de la expresión de Sam68, ya que la regulación a la baja de Sam68, disminuyó la síntesis de proteínas y DNA mediado por leptina.

Conclusión: Sam68 participa en las principales vías de señalización de LEPR para mediar el efecto trófico y proliferativo de la leptina en células trofoblásticas.

P18m-19

Sam68 media el crecimiento celular estimulado por leptina, participando en la señalización del receptor de leptina en células trofoblásticas JEG-3

Flora Sánchez Jiménez¹, Antonio Pérez Pérez¹, Antonio M. Carmona Fernández¹, Julieta Maymó², Yésica Gambino², Cecilia Varone², Carmen González-Yanes¹ y Víctor Sánchez-Margalet¹

¹Hospital Universitario Virgen Macarena, Bioquímica Clínica, Sevilla, ²Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina)

P18r-20

Del núcleo a la mitocondria, conexiones entre el metabolismo de carbohidratos y la morfología mitocondrial

Alejandra Fernández-Cid, Pilar Herrero y Fernando Moreno

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Oviedo

La proteína Mig2 de *Saccharomyces cerevisiae* está descrita como un factor transcripcional implicado en la represión por glucosa del gen *SUC2* en ausencia de Mig1. Hasta el momento, Mig1 y Mig2 se consideran proteínas redundantes, siendo Mig1 el represor transcripcional principal.

En este trabajo demostramos que Mig2 presenta una doble localización subcelular. En presencia de altas

concentraciones de glucosa, Mig2 se encuentra en el interior del núcleo donde es responsable, en colaboración con Mig1, de la represión de genes como *SUC2* o *GALI*. Sin embargo, en ausencia de glucosa Mig2 abandona el núcleo y se asocia a la red mitocondrial. Aunque Mig2 no dispone de ninguna secuencia de localización mitocondrial conocida, hemos inmunopurificado una proteína mitocondrial implicada en el mantenimiento de la morfología de estos orgánulos, capaz de interactuar con Mig2 de manera dependiente de glucosa. Esta interacción parece ser responsable de la asociación que Mig2 presenta con la red mitocondrial. En relación al papel de Mig2 en las mitocondrias, hemos observado que un mutante *mig2* muestran una morfología mitocondrial alterada que se caracteriza por presentar túbulos incompletos y agregados. Por otra parte, la delección del gen *MIG2* es capaz de revertir el fenotipo mitocondrial anómalo propio de determinados mutantes en la ruta de fisión mitocondrial. En resumen, en este trabajo presentamos una nueva función de la proteína Mig2. Nuestros experimentos muestran que está implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial a través de la ruta de fusión.

P18m-21

Incremento de la síntesis de proteínas en placenta de mujeres con diabetes gestacional

Antonio Pérez Pérez¹, Flora Sánchez- Jiménez¹, Antonio Manuel Carmona Fernández¹, Yésica P. Gambino², Julieta L. Maymó², Cecilia L. Varone² y Víctor Sánchez-Margalet¹

¹Hospital Universitario Virgen Macarena, Bioquímica Clínica, Sevilla, ²Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina)

La diabetes gestacional es la condición fisiopatológica más frecuente asociada con el embarazo que aumenta el riesgo de morbi-mortalidad perinatal. Las embarazadas con diabetes gestacional tienen resistencia a la insulina y altos niveles de insulina y leptina en plasma. Ya que nosotros hemos encontrado que la leptina estimula la síntesis de proteínas por activación de la maquinaria de transducción, nos propusimos estudiar la expresión de leptina y de su receptor, así como su activación, que podría correlacionar con la síntesis de proteínas en placenta de embarazo con diabetes gestacional en comparación con placenta de embarazo normal.

Recogimos 10 placentas de embarazo normal y 10 placentas de embarazo con diabetes gestacional. Medimos los niveles de expresión de leptina y de su receptor por Real

time-PCR y Western-blot. Estudiamos la señalización por inmunoblot usando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada (forma activa) de las proteínas implicadas en la cascada de señalización, ej: STAT-3, ERK, PKB, así como de S6 quinasa, EIF4EBP1 e EIF4E. La síntesis de proteínas la valoramos con experimentos de incorporación de leucina tritiada.

Encontramos un aumento significativo en la expresión de leptina y de su receptor, así como de su señalización, en las placentas de embarazos con diabetes gestacional en comparación con embarazos normales. Además, también encontramos en las placentas de embarazos con diabetes gestacional un aumento en la tasa de síntesis de proteínas con respecto a los controles.

Estos resultados proporcionan nuevos datos para el entendimiento de los mecanismos moleculares que subyace en el aumento de crecimiento en la placenta de diabetes gestacional.

P18r-22

Role of PDK1 and PKC orthologs in *S. cerevisiae*: a chemical-genetic approach as a tool to develop anti-fungal compounds

Daniel Pastor-Flores¹, Ricardo M. Biondi¹ y Antonio Casamayor²

¹Biomedical Research Laboratory, Johann Wolfgang Goethe University Hospital of Frankfurt, Frankfurt am Main (Germany), ²Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona)

Protein kinases (PK) play important roles in humans and in fungal organisms by regulating the state of phosphorylation of proteins in response to intra- or extracellular signals. AGC family of PK kinases, to which Pkh's and Pkc1 belong (PDK1 and PKC in human, respectively), are also part of the signaling pathways that control cell wall synthesis in yeasts and related pathogenic fungal and, therefore, are potential targets for drug development against fungal infections. The Cell Wall Integrity pathway (CWI) in *S. cerevisiae* is required to maintain cell shape, formation of a bud and hence cell division. Many aspects of the construction of the cell wall and stress signaling are conserved between *S. cerevisiae* and pathogenic species, especially the budding yeast *C. albicans*.

In our group we designed a conditional PDK1 knock-out in *S. cerevisiae*. The overexpression of the *bck1-20* allele, the target of Pkc1, keeps the cell alive in the PDK1 knock-out strain. We built a focused library of compounds directed to a regulatory site that is present in the small lobe of the

catalytic domain of a group of AGC kinases. From our point of view, the research using a chemical-genetic approach serves to understand the CWI signaling pathway in fungal organisms. Especially, we are evaluating the possibility to use AGC kinases from this pathway as a target for small compounds with anti-fungal activity.

P18-23

Implicación de Dlk1 en la activación del macrófago

M^a Julia González Gómez, Eva M^a Monsalve Argandoña, Almudena Ruiz García, Jorge Laborda Fernández, M^a José Martínez Díaz-Guerra y M^a José Ruiz Hidalgo

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina/Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB). Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete

DLK1 es una proteína de membrana que pertenece a la familia de proteínas EGF-homeóticas, en la que se incluyen los receptores NOTCH y sus ligandos. En el sistema inmune, DLK1 y los receptores NOTCH se han implicado en la diferenciación linfóide y mielóide así como en la generación y mantenimiento de células madre hematopoyéticas embrionarias. En estudios previos, hemos observado que los macrófagos activados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) aumentan la expresión y activación de NOTCH1, lo que potencia la respuesta inflamatoria al incrementar la actividad de NF- κ B. Por otro lado, también hemos demostrado que DLK1 puede interactuar con NOTCH1 *in vitro* e inhibir su actividad, al impedir la unión del receptor con sus ligandos canónicos. Dado que NOTCH1 tiene un papel importante en la activación del macrófago y que DLK1 podría bloquear su efecto, hemos investigado el papel de DLK1 en este proceso utilizando macrófagos peritoneales de ratones deficientes en este gen (*Dlk1* KO), en comparación con macrófagos de ratones silvestres (*Dlk1* WT).

Los datos obtenidos indican que al activar los macrófagos con agentes que inducen la síntesis de interferón de tipo I, como LPS y Polí I:C, los niveles de IFN β y de algunas proteínas implicadas en su síntesis, como IRF3 o IRF7, son mayores en ausencia de *Dlk1*. Además, algunas proteínas clave en la respuesta a interferón, como STAT1 o IRF1, también aumentan su expresión y su activación en ausencia de *Dlk1*. Por tanto, la ausencia de *Dlk1* parece potenciar la respuesta inflamatoria en el macrófago, en concordancia con una mayor activación de la señal de NOTCH1, lo que sugiere que DLK1 puede actuar bloqueando el efecto de NOTCH1 en la activación del macrófago.

P18r-24

V600E B-RAF participa en la transición epitelio-mesénquima mediada por TGF- β 1 en carcinoma papilar tiroideo

Pablo Baquero Valls, Irene Sánchez-Hernández, Eva Jiménez Mora y Antonio Chiloeches Gálvez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid

La cascada de transducción de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) tiene un papel fundamental en la migración e invasión celular. Dentro de los componentes de esta vía, se ha encontrado la mutación V600E en la serina/treonina quinasa B-RAF en aproximadamente el 35%-65% de los carcinomas papilares tiroideos (PTC). Diversos estudios han asociado la forma mutada V600E B-RAF con la progresión de PTC a fenotipos más invasivos y con un peor pronóstico de la enfermedad. V600E B-RAF regula la expresión de genes epiteliales y mesenquimales, induciendo la transición epitelio-mesénquima (EMT) y contribuyendo así al aumento de la capacidad invasiva del tumor. Por otra parte, la citocina TGF- β 1 también es capaz de desencadenar EMT en células tumorales.

En este trabajo estudiamos la implicación de V600E B-RAF en el desarrollo de PTC, así como su relación con TGF- β 1 en la regulación de genes involucrados en la EMT. Para ello, utilizamos líneas celulares derivadas de PTC que expresan WT B-RAF o el mutante V600E B-RAF.

Nosotros observamos que la eliminación de la expresión de V600E B-RAF aumenta los niveles de E-cadherina y reduce los niveles de su represor Snail-1, disminuyendo la migración celular. Por el contrario, la sobreexpresión de V600E B-RAF en células con WT B-RAF aumenta tanto el fenotipo mesenquimal como la migración e invasión celular. Por otra parte, el tratamiento con TGF- β 1 aumenta la expresión de Snail-1, con la consiguiente reducción de los niveles de E-cadherina. Además, los efectos del TGF- β 1 se bloquean con la inhibición de V600E B-RAF y MEK.

Estos datos demuestran la importancia de V600E B-RAF en la regulación de la EMT mediada por TGF- β 1 y su papel en el aumento de la capacidad invasiva de PTC.

P18r-25

La karioferina Kap60/Kap95 es responsable de la importación nuclear de la hexoquinasa 2 de *Saccharomyces cerevisiae*

Paula Fernández García¹, Rafael Peláez Cristobal², Fernando Moreno Sanz¹ y Pilar Herrero Espílez¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo, Oviedo, ²CIMA. Universidad de Navarra, Pamplona*

La Hxk2 de *S. cerevisiae*, es una proteína *moonlighting* que funciona como una glucosa quinasa en el citosol y como un factor transcripcional en el núcleo celular. Esta doble localización, hace que Hxk2 mantenga un flujo de entrada y salida del núcleo. El mecanismo de exportación nuclear ha sido descrito recientemente y tiene lugar a través de la exportina XpoI (Crm1). Las secuencias de exportación nuclear (NES) presentes en la proteína son determinantes para su interacción con la exportina, mientras que la regulación del sistema es dependiente de los niveles de glucosa presentes en el medio y del estado de fosforilación de la Ser14 de la Hxk2 [1]. El sistema de importación nuclear por el que Hxk2 entra al núcleo, no había sido descrito hasta ahora.

En esta comunicación mostramos datos de cómo la proteína Hxk2 utiliza el sistema de importación nuclear Ka60/Kap95, así mismo hemos localizado en la Hxk2 una secuencia de localización nuclear (NLS), diana de reconocimiento para estas karioferinas. Hemos estudiado las interacciones de la proteína con ambas importinas y la importancia de la secuencia NLS en dichas interacciones, las cuales están reguladas por los niveles de glucosa presentes en el medio. Por otra parte analizamos el posible papel de la Ser14 en la regulación de este proceso tanto a nivel de interacción con las importinas, como a nivel de localización subcelular.

[1] Peláez R. *et al. JBC* 2009; 284: 20548.

P18-26

Regulation of muscle stem cell functions by the p38 MAPK signaling pathway

Laura García-Prat, Vanessa Ruiz-Bonilla, Eusebio Perdiguero, Monica Zamona y Pura Muñoz-Cánoves

Pompeu Fabra University, Cell Biology Group, CIBERNED and ICREA, Barcelona

The p38 MAPK signaling pathway is considered a critical regulator of myoblast differentiation *in vitro*. Our group also showed that this pathway is required for cessation of myoblast proliferation prior to entering the differentiation phase, while Jones et al (2005) reported that it also functions as a molecular switch to activate the quiescent muscle stem cell (satellite cell). We have therefore investigated in further detail the function of p38 MAPK during the distinct stages of myogenesis. Using a combination of approaches we have monitored the behavior

of satellite cells and compared their maintenance in quiescence and self-renewal potential in WT and p38alpha-deficient mice. In particular, we have performed immunostaining of key markers (Pax7, MyoD and Mgn) in single myofiber-associated satellite cells and in FACS isolated satellite cells from the adult muscle of Pax7-Cre/ROSA-YFP reporter mice (in WT and p38alpha-deficient backgrounds) in basal state and after muscle injury. Altogether, our results suggest that the p38 MAPK signaling pathway plays a pivotal role in postnatal myogenesis, regulating discrete and independent steps of this process, possibly through its action on distinct effector molecules.

P18r-27

Low temperature highlights the functional role of the CWI pathway in the regulation of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*

Isaac Córcoles Sáez¹, Lidia Ballester Tomás¹, M^a Ángeles de la Torre Ruíz², José Antonio Prieto Alamán¹ y Francisca Rández Gil¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Paterna, Valencia, ²Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

All eukaryotic cells make use of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) to relay extracellular signals and activate the appropriate cell response [1]. Concretely, in *S. cerevisiae* there are five central MAPKs, Fus3p, Kss1p, Hog1p, Slt2p and Smk1p, which control the mating, filamentous growth (FG), high osmolarity glycerol (HOG), cell wall integrity (CWI) and sporulation pathways, respectively [2,3]. From them, there is no signal transduction pathway or transcription factor known to respond exclusively to low temperatures. Although the existence of such a pathway cannot be ruled out, available data point out that known signal transduction mechanisms, operating under other kinds of stimuli, may also be triggered by cold stress. Concretely, cold-activation of Hog1p triggers a specific transcriptional program at low temperature, increases the synthesis of glycerol and determines freeze survival in yeast cells [4]. Nevertheless, the Hog1-mediated signalling is only required for the expression of a sub-set of cold-induced genes. Here, we show that lack of a functional CWI pathway compromises the growth of *S. cerevisiae* at low temperature. Consistent with this, exposure of yeast cells to a downward shift in temperature results in Slt2p phosphorylation and triggers a Slt2p-dependent transcriptional response. Moreover, our data suggests that Slt2p plays direct and indirect effects in mediating yeast growth at low temperature.

- [1] Cargnello and Roux. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75: 50-83.
 [2] Qi and Elion. *J Cell Sci* 2005; 118: 3569-72.
 [3] Chen and Thorner. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1311-40.
 [4] Panadero *et al.* *J Biol Chem* 2006; 281: 4638-45.

P18-28

Identificación de la E3 ubiquitín ligasa responsable de la degradación de CDK1

Joaquín Herrero-Ruiz¹, Servando Giráldez¹, Mar Mora-Santos¹, M. Cristina Limón-Mortés¹, Miguel Á. Japón², María Tortolero¹ y Francisco Romero¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, ²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

La transición G2/M depende en eucariotas de la actividad del complejo CDK1-ciclina B, también conocido como MPF (*maturation-promoting factor*). Aunque el control de la actividad del MPF está bien establecido con respecto a la fosforilación y desfosforilación de CDK1 en los residuos Thr14, Tyr15 y Thr161, se conoce poco sobre el control proteolítico de CDK1. Recientemente se ha demostrado que CDK1 se degrada cuando se somete a la célula a estrés genotóxico y que la quinasa PKR (*double-stranded RNA-activated protein kinase*) está implicada en este proceso. PKR fosforila a CDK1 en Tyr4 facilitando su ubiquitinación y degradación via proteasoma. Además, la parada en G2 causada por doxorubicina está asociada a la degradación de CDK1 mediada por esta quinasa. De hecho, en esas condiciones, se activa p53 que induce a PKR y esta fosforila a CDK1. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la ubiquitín ligasa responsable de la degradación de CDK1. En un escrutinio para buscar nuevos sustratos de la ubiquitín ligasa SCF β TrCP identificamos a CDK1 como una proteína que viene asociada a β TrCP en estudios de coimmunoprecipitación seguidos de la determinación de los inmunocomplejos por espectrometría de masas. β TrCP es una F-box muy versátil, que controla el ciclo celular y diversas vías de transmisión de señal. Interviene en la degradación de importantes reguladores del ciclo como son EMI1/2, WEE1A y CDC25A/B. β TrCP reconoce el motivo de destrucción DSG(X)2+nS, en el que las serinas tienen que estar fosforiladas. También media la ubiquitinación y degradación de la β -catenina y de I κ B, el inhibidor del factor nuclear de transcripción NF κ B. En este trabajo mostraremos los resultados obtenidos para determinar que β TrCP es responsable de la ubiquitinación y posterior degradación de CDK1.

P18-29

Papel de la isoformas de AKT en la migración de células cancerígenas prostáticas

Omar Motiño García-Miguel, Ariel E. Cariaga-Martínez, M. Alicia Cortés, F. Javier Rodríguez-Ubrea y Pilar López-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

Actualmente no existen terapias efectivas para el cáncer de próstata metastásico por lo que es necesario identificar los cambios moleculares implicados en la formación de metástasis para diseñar nuevas estrategias terapéuticas. La quinasa AKT es un elemento fundamental en la transducción de señales mediadas por PI3K. En el cáncer de próstata, el aumento de su actividad se ha vinculado a la progresión tumoral. AKT presenta tres isoformas y no se conoce con precisión el papel de cada una de ellas en la progresión tumoral. El objetivo de este trabajo es analizar el papel de las isoformas AKT1 y AKT2 en el control de la migración de las células cancerígenas prostáticas PC3 disminuyendo sus niveles mediante interferencia por RNA. La depleción de AKT1 disminuyó la migración celular y provocó un descenso en la actividad de FAK y SRC. Por el contrario, la depleción de AKT2 aumentó la migración celular y la actividad de FAK y de SRC provocando cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina, compatibles con un fenotipo migratorio, aunque también incrementaron los niveles de E-cadherina, un claro marcador de fenotipo epitelial. Sin embargo, E-cadherina sigue localizada en el citosol, probablemente debido al aumento de la actividad de SRC, ya que la inhibición de esta quinasa provoca su desplazamiento a la membrana y disminuye drásticamente la migración celular. Nuestros resultados muestran que las isoformas de AKT1 y 2 regulan de forma opuesta la migración celular y que la depleción de AKT2 induce la adquisición de un fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal probablemente debido al aumento de la actividad de SRC.

Nota: Financiación: Junta de Comunidades Castilla-La Mancha. (PII1109-0225-5587).

P18-30

Identificación y caracterización de una nueva isoforma de las quimerinas

Victoria Casado Medrano¹, Laura Barrio Real², Rogelio González Sarmiento² y María José Caloca Roldán¹

¹Instituto de Biología y Genética Molecular. CSIC/Uva, Valladolid, ²Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca, Salamanca

Las quimerinas son una familia de proteínas GAP que regulan de manera selectiva a la GTPasa Rac. Hasta el momento se han descrito cuatro isoformas de la familia de las quimerinas en mamíferos: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - y $\beta 2$ -quimerinas. Estas proteínas tienen un dominio C1 que une DAG y ésteres de forbol, un dominio GAP que inactiva selectivamente a Rac, y un dominio SH2, solo presente en las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ de las quimerinas.

Las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de las quimerinas se generan por transcripción alternativa del gen *chn2*. Este gen consta de 13 exones y posee un inicio alternativo de la transcripción en el exón1, a partir del cual se genera la isoforma $\beta 2$, y un sitio alternativo en el intrón 6, a partir del cual se genera la isoforma $\beta 1$. Un análisis de la expresión de estas proteínas en diferentes líneas celulares y tejidos tumorales nos ha permitido identificar una nueva isoforma de las quimerinas que se genera por *splicing* alternativo y que denominamos $\beta 1$ -CHNdel ex7p. Esta isoforma tiene una delección parcial del exón 7 que se produce por la utilización de un sitio críptico de procesamiento a 135 bp del final del exón. A nivel estructural, $\beta 1$ -CHNdel ex7p conserva intacto el dominio GAP, pero pierde 4 aminoácidos del dominio C1. La caracterización funcional de esta isoforma indica que mantiene la actividad GAP frente a Rac, pero pierde la regulación por DAG que se realiza a través del dominio C1. Además, esta proteína tiene una marcada localización nuclear no observada en el resto de las isoformas. Estos datos sugieren que las quimerinas pueden tener funciones adicionales a las descritas hasta el momento.

P18m-31

Skeletal muscle myogenesis is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2

Lucía García-Guerra, Rocío Vila-Bedmar, Sonia Fernández-Veledo, Cristina Murga, Federico Mayor Jr., Margarita Lorenzo y Iria Nieto-Vazquez
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid

GRK2 is the more ubiquitous G protein-coupled receptor kinase isoform and, additionally to its role in GPCR desensitization, it has been implicated in the modulation of different intracellular signalling pathways. Recently, GRK2 has been identified as a novel inactivating kinase of p38MAPK that interferes with 3T3L1 differentiation. Therefore, a possible role for GRK2 in the differentiation of myocytic cells remains to be explored. In this regard, the main objective was to investigate the contribution of GRK2

to myogenesis. We analyzed myoblast C2C12 differentiation and cell cycle protein expression. In this issue we generated stable cell lines that overexpressed wild-type GRK2 or GRK2 catalytically-deficient mutant (K220R). Overexpression of wild-type GRK2 impaired the myoblast fusion and the expression of myogenic markers. These cells were unable to activate not only p38MAPK but also Akt pathways. However, cells overexpressing GRK2 kinase-deficient mutant differentiated in the same way as wild-type cells. We also analyzed the skeletal muscle phenotypic and functional differences between Wt and GRK2 hemizygous animals. GRK2^{+/-} mice exhibited increased muscle fiber size and less number of fibers compared to Wt animals. Furthermore, we also observed that this hypertrophy is consistent with increased glucose clearance into skeletal muscle in 9-month-old GRK2^{+/-} mice, suggesting that the muscle of these animals preserved its functionality better than Wt mice during the elderly. We conclude that GRK2 inactivation leads to increased Akt and p38MAPK signalling improving skeletal muscle differentiation. Our data identify GRK2 as a negative regulator of skeletal muscle myogenesis, which uncovers an important new function in the signalling networks of this protein.

P18-32

Functional mapping of the disparate activities of the yeast moonlighting protein Hal3

Asier González¹, Albert J. Abrie², Erick Strauss² y Joaquín Ariño¹

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona,

²Department of Biochemistry, Stellenbosch University, Stellenbosch (South Africa)

The *S. cerevisiae* Hal3 protein has recently been found to act as a moonlighting protein, able to function both as an inhibitory subunit of the Ppz1 protein phosphatase and as a constituent protomer of an unprecedented heterotrimeric phosphopantothienylcysteine decarboxylase (PPCDC), the third enzyme of the CoA biosynthetic pathway. In this work we initiate the dissection of the structural elements required for both disparate cellular tasks by using a combination of biochemical and genetic approaches. We show that the conserved central Hal3 core is necessary for both functions, as determined by *in vitro* and *in vivo* assays, and that removal of the insertion sequence in this domain has little effect on either function. The N-terminal domain is not functional by itself, although it has a relevant function in Hal3's heteromeric PPCDC activity in combination with the core. In regards to Ppz1 regulation, Hal3's acidic C-

terminal domain has a key role when combined with the central core, whereas removal of the N-terminal domain has lesser effects. Finally, the loss of two essential residues in Hal3 that are usually required for monofunctional PPCDC activity is not detrimental for its Ppz1-related functions, and that reintroduction of these residues is not sufficient to convert it to such a monofunctional PPCDC. Taken together, our work highlights specific structural determinants that could be exploited for full understanding of Hal3 cellular functions.

P18r-33

Functional interaction between potassium and phosphate homeostasis in yeast

David Canadell¹, Carlos Casado¹, Asier González¹, Lina Barreto¹, Amparo Ruiz², Antonio Casamayor¹ y Joaquín Ariño¹

¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona,

²Department of Genetics and Development, Columbia University, New York (USA)

The Ppz1 protein phosphatase negatively modulates K⁺ uptake by regulating the high-affinity Trk1 and Trk2 transporters. Ppz1 is, in turn, inhibited by two regulatory subunits: Hal3 and Vhs3. Transcriptomic analysis of a conditional *tetO:HAL3 vhs3* mutant, which exhibits enhanced Ppz1 activity, shows potent induction of a set of genes known to respond to phosphate starvation. Induction of *PHO84*, a prototypic phosphate-responsive gene encoding the high-affinity H⁺-phosphate cotransporter, is dependent on the presence of Ppz1, increases when the phosphatase is overexpressed, and is fully blocked in the absence of Pho81, an intracellular sensor of phosphate levels. The conditional *tetO:HAL3 vhs3* mutant is unable to grow in medium with low amounts of phosphate (LowP), and this defect is eliminated by deletion of Ppz1.

These results suggested that the possible interference with the high-affinity potassium transport caused by deregulation of Ppz1 could trigger a phosphate starvation-like response. To confirm this hypothesis we carried out a time-course transcriptomic profiling of wild type cells subjected to potassium deprivation. Again, a full response of phosphate-regulated genes was elicited. *PHO84* response was dependent on the Pho81 sensor. Furthermore, cells lacking high affinity K⁺ transport (*trk1 trk2* mutants) cannot grow in lowP medium unless supplemented with high amounts of KCl. Therefore, it seems evident that interfering with normal potassium uptake compromises normal phosphate homeostasis, triggering a response that mimics

phosphate starvation. To our knowledge, this is the first time that potassium and phosphate homeostasis are found to be functionally linked in eukaryotic cells.

Note: Supported by grants BFU2008-04188-C03-01 and EUI2009-04147 (SysMo2).

P18-34

La estabilidad de la proteína RCAN3 humana está regulada por fosforilación

Sergio Martínez-Høyer¹, Eva Serrano-Candelas¹, Álvaro Aranguren Ibáñez¹, Jordi Vilardell Vila², Emilio Itarte Fresquet² y Mercè Pérez-Riba¹

¹Laboratori de Genètica Molecular, Institut Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

La familia de proteínas reguladoras de calcineurina (RCAN, antes denominadas calcipresinas o DSCR1) modula la actividad de calcineurina (Cn) respecto a la activación de la familia de factores de transcripción NFATc. En humanos, la familia de las RCAN consta de tres proteínas: RCAN1, RCAN2 y RCAN3. Además del motivo FLISPP, que se considera como la seña identificativa de la familia en eucariotas, las RCAN poseen un motivo de anclaje a Cn denominado CIC que es responsable de la inhibición de la expresión génica dependiente de los NFATc. Con objeto de profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación de las proteínas RCAN, en concreto de RCAN3, se analizó si existía regulación postraducciona por fosforilación de dicha proteína. Así, por predicción bioinformática identificamos un posible centro de fosforilación en la región N-terminal de RCAN3 (Ser18), no conservado en el resto de la familia, y susceptible de fosforilación por la proteína quinasa CK2. Mediante ensayos de fosforilación por marcaje con ³²P-ortofosfato en células HEK293T que sobreexpresan RCAN3 o formas mutadas en los posibles centros de fosforilación, se ha demostrado que RCAN3 es una fosfoproteína y que las dos Ser del motivo FLISPP y la Ser18 son centros de fosforilación. Además RCAN3 es sustrato de CK2 *in vitro* y la mutación Ser18Ala disminuye su fosforilación. En ensayos funcionales, la fosforilación de dicho residuo de RCAN3 no afecta ni a la interacción con Cn ni a la capacidad inhibidora de RCAN3 sobre la actividad NFATc. Sin embargo, la mutación Ser18Ala aumenta de forma clara la vida media de RCAN3. Establecer los mecanismos moleculares que regulan las

RCAN es importante para determinar su relevancia fisiológica en el contexto celular.

P18m-35

Efecto de la inyección intracerebroventricular de leptina en la respuesta inflamatoria y estrés de retículo asociados a la resistencia a insulina con la edad en el hígado de rata

Cristina Pintado Losa¹, Aurora Salamanca Molina¹, Brenda Barcena García¹, Alejandro Fernandez Briones¹, Virginia López Gómez¹, Cristina Mora Herrera¹, María Rodríguez Pérez², Carmen Arribas Mocoroa², Nilda Gallardo Alpizar¹ y Antonio Andrés Hueva¹

¹Área de Bioquímica. Facultad de Químicas. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Puertollano, ²Área de Bioquímica, Facultad de Bioquímica y Medio Ambiente. CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo

La obesidad se asocia a una situación de estrés de retículo y al desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica moderada en tejidos metabólicamente activos, como el hígado y tejido adiposo blanco (TAB). Se ha propuesto que ambos eventos representan un vínculo fundamental entre la obesidad y otras patologías asociadas, tales como resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, además de constituir dos marcadores característicos asociados al envejecimiento. Por otra parte, el envejecimiento está asociado a un aumento de la adiposidad, dislipemia y resistencia global a la insulina. Se ha propuesto que el estado de inflamación crónica y de estrés de retículo en esta situación subyace al desarrollo de resistencia a la insulina. Nuestro grupo ha descrito recientemente el papel a nivel central de la leptina previniendo la acumulación intrahepática de grasa. Por lo tanto nos planteamos estudiar si la inyección central de leptina modula la respuesta inflamatoria y el estrés de retículo asociada a la edad y al aumento de la adiposidad en el hígado de rata. Con este objetivo se ha medido mediante RT-PCR la expresión de marcadores proinflamatorios (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y antiinflamatorios (IL-10) y mediante Western blot la expresión de marcadores implicados en la respuesta a estrés de retículo (Grp-78, Grp-94, eIF-2, IRE, JNK, Xbp1) en el hígado de rata a diferentes edades previamente expuestas a nivel central a la leptina durante 7 días. La leptina modifica la expresión de citoquinas inflamatorias y mejora la respuesta a estrés de retículo, por lo tanto podría incidir sobre la sensibilidad a la insulina.

P18-36

Role of the MEK/ERK pathway in the regulation of GSK-3 and glycogen synthase phosphorylation and activity in cultured myotubes

Marta Montori-Grau¹, Núria Tarrats², Lucía Serrano-Marco³, Manuel Vázquez-Carrera³ y Anna M^a Gómez-Foix¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, CIBERDEM, Barcelona, ²IDIBAPS. Liver Unit-Hospital Clínic, CIBEREHD, and Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona. ³Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Barcelona

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) was originally identified by its ability to phosphorylate and inactivate glycogen synthase (GS), which limits glycogen synthesis. The GSK-3 and GSK-3 β isoforms are widely expressed, although in skeletal muscle mainly GSK-3 β mediates GS stimulation by insulin. Phosphorylation of Ser(21) in GSK-3 α and Ser(9) in GSK-3 β inactivates the kinase, whereas no clear role for Tyr phosphorylation is defined. A major signaling pathway that regulates GSK-3 is the insulin-responsive PI3K/AKT pathway, but there is evidence that it is downstream of the mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-pathway. Here we studied the contribution of the MEK/ERK pathway into regulation of GSK-3 and GS phosphorylation/activity and its glucose dependence in cultured myotubes. The MEK1/2 inhibitor U0126 reduced the phospho-GSK3 β Ser(9) and phospho-GSK3 α / β Tyr(279/216) content in myotubes, while tended to increase GSK-3 β activity, independently of glucose. U0126 activated GS and reduced phospho-GS (Ser641/0) level, after glucose-depletion. The GSK-3 inhibitor SB415286 markedly reduced GSK-3 β activity irrespective of glucose incubation; while activated GS more in glucose-depleted cells and decreased phospho-GS (Ser641/0) level only in glucose-depleted cells. Thus, the MEK/ERK pathway constitutively phosphorylates GSK-3 β at Ser(9) and GSK3 α / β at Tyr(279/216). Inhibition of MEK/ERK tends to activate GSK-3 β , but also GS in glucose-depleted cells. The MEK/ERK pathway leads to GS inactivation without GSK-3 β involvement and may mediate glycogen synthesis regulation by its activators.

P18e-37

Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1 ϵ -dependent phosphorylation of p120-catenin

Beatriz del Valle-Pérez¹, David Casagolda¹, Ero Lugilde¹, Gabriela Valls¹, Montserrat Codina¹, Natalia Dave², Antonio García de Herreros² y Mireia Duñach¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,

²IMIM-Hospital del Mar, Barcelona

Cell-cell interactions play vital roles in developmental morphogenesis, tissue remodeling and carcinogenesis. One of the major epithelial cell-cell adhesion molecules, E-cadherin, constitutes the core of adherent junctions through its homophilic interaction with identical proteins from neighbour cells and it is frequently lost in human cancers. p120-catenin is an E-cadherin-associated protein that modulates its function and stability. In response to Wnt3a, p120-catenin is phosphorylated at Ser268 and Ser269, disrupting its interaction with E-cadherin (Casagolda et al., 2010). We describe that Wnt-induced p120-catenin phosphorylation at Ser268 and Ser269 also enhances its binding to the transcriptional factor Kaiso, preventing the repression of the β -catenin-Tcf-4 transcriptional complex mediated by Kaiso. This repression is due to its association not only with Tcf-4 but also with β -catenin. Disruption of Tcf-4-Kaiso and β -catenin-Kaiso interactions by p120-catenin not only releases Tcf-4 and β -catenin enabling its mutual association and the formation of the transcriptional complex but also permits Kaiso binding to methylated CpG islands, an interaction that is weakly inhibited by p120-catenin. Consequently, Wnt stimulates Kaiso association to the CDKN2A promoter, which contains CpG sequences, in cells where these sequences are extensively methylated, such as HT-29 M6, an effect accompanied by decreased expression of its gene product. These results indicate that, when released from E-cadherin by Wnt3a-stimulated phosphorylation, p120-catenin controls the activity of the Kaiso transcriptional factor, enhancing its binding to repressed promoters and relieving its inhibition of the β -catenin-Tcf-4 transcriptional complex.

P18-38

Regulación de la proteína PSTPIP1 por fosforilación en tirosinas y su implicación en la enfermedad PAPA

Tamara Marcos de Mena, Yolanda Bayón Prieto y Andrés Alonso García

Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid, CSIC, Valladolid

La proteína PSTPIP1 (Pro, Ser, Thr, phosphatase interacting protein 1), también conocida como CD2BP1, consta de un dominio F-BAR en la región N-terminal y de un dominio SH3 en la región C-terminal. Está implicada en la regulación del citoesqueleto de actina a través de su asociación con proteínas como Dinamina y WASP. Mutaciones de la proteína PSTPIP1 (A230T y E250Q) producen la enfermedad autoinflamatoria, de carácter autosómica dominante, PAPA (pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acné), así como el aumento de los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . La enfermedad con la que se relaciona a esta proteína se caracteriza por brotes inflamatorios relacionados con la aparición de lesiones articulares y cutáneas, como el pioderma gangrenoso o el acné quístico, y también con la infiltración de neutrófilos. PSTPIP1 es fosforilada en tirosinas por la kinasa Abl y desfosforilada por una fosfatasa del grupo PEST llamada PTP-PEST, que interacciona con el dominio F-BAR. Las mutaciones de PSTPIP1 implicadas en la etiología del PAPA provocan una menor interacción con la fosfatasa PTP-PEST lo que conduce a un aumento en la fosforilación en tirosinas, especialmente en la Tyr 345. De este modo, pretendemos estudiar como la fosforilación en tirosinas de PSTPIP1 y sus mutantes afecta a la producción de IL-1 β , citoquina clave en el proceso inflamatorio. En concreto, pretendemos identificar los estímulos y las kinasas implicadas en la fosforilación en tirosinas de PSTPIP1 y su regulación por las fosfatasas de la familia PEST para determinar cómo esta fosforilación contribuye a la regulación de la respuesta inflamatoria.

Nota: Este trabajo es financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICCIN), la Junta de Castilla y León y la Fundación Ramón Areces.

P18-39

Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls prophase centrosome separation through Nek6/7 and the mitotic kinesin Eg5

M. Teresa Bertran¹, Sara Sdelci¹, Laura Regué¹, Joseph Avruch², Carme Caelles³ y Joan Roig¹

¹Cell Signalling Research Group, Molecular Medicine Program, IRB Barcelona, Barcelona, ²Department of Molecular Biology and Medical Services, Massachusetts, General Hospital and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston (USA), ³Cell Signalling Research Group, Molecular Medicine

Program, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Department of Biochemistry and Molecular Biology (Pharmacy), Universitat de Barcelona, Barcelona

The NIMA-family protein kinases Nek9 and the highly similar Nek6 and Nek7 form a signaling module activated during mitosis and required for normal mitotic spindle assembly. The module upstream kinase, Nek9 (also known as Nerc1), is activated at centrosomes during prophase through a mechanism that involves phosphorylation, although the molecular details of this have remained elusive. We have identified the Polo-family kinase Plk1 as Nek9 direct activator and propose a multi-step activation mechanism for Nek9 that involves phosphorylation by CDK1 resulting in Plk1 binding to Nek9 followed by Nek9 phosphorylation and activation by Plk1. Our results provide a basis to understand the temporal and spatial pattern of Nek9 activation, integrate signaling through the NIMA-family with that of CDK1 and Plk1, and suggest new ways through which these two major mitotic kinases could control the organization and function of the mitotic machinery. In this regard we show how downstream of CDK1 and Plk1, Nek9, Nek6 and Nek7 are crucial for centrosome separation during prophase as well as how this process is controlled by Plk1 through the activation of Nek9 and ultimately the phosphorylation of the mitotic kinesin Eg5 at Ser1033, a Nek6/7 site that together with the CDK1 site Thr926 is necessary for the accumulation of Eg5 at centrosomes and subsequent centrosome separation. Failure to phosphorylate Eg5[Ser1033] results in longer prometaphases showing the importance of prophase centrosome separation for a timely mitosis.

P18-40

Regulación de la homeostasis de cationes en levadura por Ypi1, una subunidad reguladora de la fosfatasa Glc7, a través de un mecanismo Glc7-independiente

Maribel Marquina¹, Asier González¹, Ivan Muñoz², Amparo Ruiz³, Lina Barreto¹, Mari Carmen Álvarez⁴, José Ramos⁴ y Joaquín Ariño⁵

¹*Yeast Molecular Biology Laboratory, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès,* ²*Medical Research Council Protein Phosphorylation Unit, Sir James Black Centre, University of Dundee, Dundee, Scotland (UK),* ³*Department of Genetics and Development, Columbia University, New York (USA),* ⁴*Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba,* ⁵*Yeast Molecular Biology*

Laboratory, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

El mantenimiento de la homeostasis de cationes es un proceso clave para cualquier organismo vivo. Estudios de sobreexpresión indican que Ypi1, una de las dos subunidades reguladoras esenciales de la fosfatasa Glc7, incrementa la tolerancia a cloruro de litio de una cepa salvaje. Este efecto es independiente de Glc7 ya que la sobreexpresión de una forma de Ypi1 incapaz de unirse a la fosfatasa (Ypi1 W53A) genera el mismo fenotipo. Esta halotolerancia se mantiene en ausencia de las fosfatasas Ppz1/Ppz2, que constituyen un importante elemento regulador del mecanismo de tolerancia salina en *Saccharomyces cerevisiae*. Por el contrario, el fenotipo depende de los transportadores de potasio de alta afinidad, Trk1/Trk2, y del principal detoxificador de Na⁺, K⁺ y Li⁺ intracelular, la ATPasa Ena1. En concordancia, ensayos de expresión empleando un *reporter* β-galactosidasa muestran que la sobreexpresión de YPI1 incrementa los niveles de expresión de ENA1. Estos datos sugieren que Ypi1 podría estar regulando la expresión de ENA1. Finalmente, un análisis del contenido de litio intracelular revela que la sobreexpresión de YPI1 reduce la concentración intracelular de este catión, probablemente disminuyendo su captación, lo cual explicaría el fenotipo de tolerancia observado. Todos estos resultados indican que Ypi1 estaría participando en la homeostasis salina y sugieren una función a través de un mecanismo independiente de su papel como regulador de la fosfatasa Glc7.

P18r-41

A coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling

Meritxell Vinyoles¹, Oriol Arqués¹, Beatriz Del Valle Pérez¹, Antonio García de Herrerros² y Mireia Duñach¹

¹*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,* ²*IMIM-Hospital del Mar, Barcelona*

Canonical Wnt signaling pathway plays a crucial role in embryonic development and tissue homeostasis being also associated with cancer and other human diseases. Activation of the canonical Wnt pathway promotes the progressive phosphorylation of co-receptor LRP5/6 creating a phosphorylated motif that binds and inhibits GSK-3β, stabilizing β-catenin and increasing the transcription of β-catenin-target genes. CK1 kinase family members play complex roles in this pathway, either as inhibitors or activators. In this report we have dissected the roles of CK1 isoforms in the early steps of Wnt signaling. CK1ε is

constitutively bound to LRP5/6 through its interaction with p120-catenin and E-cadherin and is activated upon Wnt3a stimulation. CK1a also associates to the LRP5/6-p120-catenin complex but, differently to CK1e, only upon Wnt3a stimulation. Binding of CK1a is dependent on CK1e and occurs in a complex with Axin. The two protein kinases act successively: whereas CK1e is required for early responses to Wnt3a stimulation, such as recruitment of Dvl-2, CK1a participates in the release of p120-catenin from the complex, what activates p120-catenin for further actions on this pathway. Another CK1, CK1g, acts at an intermediate level since it is not necessary for Dvl-2 recruitment but for LRP5/6 phosphorylation in Thr1473 and Axin binding. Therefore, our results indicate that CK1 isoforms work coordinately to promote the full response to Wnt signals.

P18-42

Estrés por selenito en *Saccharomyces cerevisiae*: papel señalizador de la proteína quinasa Snf1

María Pérez Sampietro, Celia Casas Herranz y Enrique Herrero Perpiñan

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida

El selenio (Se) es un elemento esencial en la dieta humana debido a su presencia en selenoproteínas. En contraste con los organismos multicelulares, no es esencial para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, donde en forma de selenito causa efectos tóxicos a concentraciones elevadas debido a la generación de estrés oxidativo. En levadura, a tiempos iniciales causa muerte necrótica, en mayor grado en ausencia de las glutaredoxinas ditiólicas Grx1 y Grx2. A tiempos tardíos, el selenito provoca muerte apoptótica independientemente de estas glutaredoxinas. Mientras que el selenito causa hipercarbonilación proteica en levadura como marcador de estrés oxidativo, este efecto es más intenso en ausencia de Grx1 y Grx2. Los efectos genotóxicos son también más elevados en dicha ausencia. En este estudio hemos realizado el análisis proteómico a diferentes tiempos de tratamiento con selenito de: (i) aquellas proteínas cuyos niveles varían significativamente, y (ii) aquellas proteínas que se hipercarbonilan diferencialmente después del tratamiento del mutante Grx1 y Grx2. Entre las proteínas caracterizadas, hay proteínas que son marcadores de estrés oxidativo (las cuales se inducen) y otras con actividad chaperona (cuyos niveles se reducen). Por otro lado, hemos estudiado los mecanismos de señalización del estrés por selenito en levadura, y hemos mostrado que la proteína quinasa Snf1 (un miembro de la familia de las AMP quinasas) también protege frente a esta

toxicidad. Se requiere la actividad completa de Snf1 para la protección frente a selenito, y Elm1 (una proteína quinasa también implicada en morfogénesis y división celular) actúa por encima de Snf1 activando a esta última en respuesta al agente.

P18r-43

A new role for Ref2, a regulatory subunit of the yeast protein phosphatase 1, in cell wall integrity

Jofre Ferrer-Dalmau, Asier González, Joaquín Ariño y Antonio Casamayor

Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

The cell wall of the budding yeast *S. cerevisiae* is required to maintain cell shape and integrity. Cell wall remodeling is regulated by the cell wall integrity (CWI) pathway, which triggers a MAP kinase cascade which activates two known transcription factors, Rlm1 and SBF. A specific mutation in Glc7, the essential catalytic subunit of yeast protein phosphatase 1, leads to a number of defects which includes CWI. We screened a set of mutants lacking non-essentials regulatory subunits of Glc7 for cell wall integrity stressors (calcofluor white, congo red, elevated growth temperature and hypo-osmotic shock). Among 20 candidates, we found two regulatory subunit mutants, *slal* and *ref2*, which yielded increased sensitivity to these conditions. We have focused on the product of the *REF2* (RNA end formation 2) gene, which we have shown to be important in cationic homeostasis. Ref2 was identified as a component of the APT (Associated to Pta1) complex, involved in mRNA 3'-end formation and snoRNA maturation. We test several mutants on members of the APT complex showing that the hypersensitivity to CWI stressors is shared by the components of the APT complex. Moreover, our results show that all of them display a constitutive basal hyperactivation of Slt2, a MAP kinase involved in regulating maintenance of CWI. The hyperactivation of Slt2 does not lead to the induction of the transcriptional response driven by Rlm1. Furthermore, here we also show preliminary results of the study of the mutation of Ref2^{F374}, a key residue within the Glc7-binding region. We hypothesize that it may exist a connection between the APT complex and the CWI pathway.

P18r-44

Signaling pathways controlling *S. cerevisiae* Pho89 expression in response to alkaline pH stress

Albert Serra, Maria Platara y Joaquín Ariño
Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Phosphate starvation triggers a signal cascade in *S. cerevisiae* involving the inhibition of the complex Pho85(CDK)-Pho80(cyclin) by Pho81(CKI). This allows the transcription factor (TF) Pho4 to enter and remain in the nucleus and therefore activate the PHO regulatory pathway genes. The high-affinity Na⁺/phosphate co-transporter Pho89 is encoded by a gene controlled by this regulatory pathway. Apart from low phosphate induction we have observed that *PHO89* strongly responds to alkaline pH. This induction occurs early after the pH shift and is maintained for at least one hour. After analyzing its promoter region we found several sequences probably involved in alkaline pH activation. Such binding motifs include CDREs (Calcineurin-Dependent Response Element), as well as target sequences for Mig2 (a transcription repressor regulated by the Snf1 kinase) and Nrg1 (a transcription repressor regulated by Rim101 and Snf1). To determine the role of these factors in *PHO89* expression we performed LacZ reporter assays using mutants lacking these TFs. As expected, *PHO89* expression in a strain lacking the calcineurin-activated TF Crz1 was strongly impaired. Both *mig2* (but not *mig1*) and *nrg1* mutants displayed an increased expression, whereas we observed less induction in *snf1* and *rim101* mutants. The analysis of mutant bearing the combined mutations indicates that Snf1 acts through Mig2 to induce *PHO89* expression whereas Rim101 controls Nrg1. These experiments showed the complexity of Pho89 expression profile and how it is controlled by other stimuli besides phosphate starvation.

P18r-45

Estudio del papel de los esfingolípidos en la vía de activación de las quinasas esenciales Pkh1 y Pkh2 de la levadura *S. cerevisiae*

Anna Bahí y Antonio Casamayor
Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

La familia de proteínas quinasas (PK) AGC comprende una serie de miembros cuyo dominio catalítico se encuentra

conservado a lo largo de la evolución. Las PK Pkh1 y Pkh2 de *S. cerevisiae* son proteínas funcionalmente redundantes entre ellas. Se ha demostrado que son estructural y funcionalmente homólogas a la proteína de mamífero PDK1. Pkh1 y Pkh2 comparten alguna función esencial entre ellas, puesto que los mutantes simples son viables pero aquellos en los que se ha eliminado ambas actividades no lo son. A nivel estructural, las proteínas PDK1 de mamífero poseen un dominio catalítico en su región N-terminal y un dominio PH, esencial para la unión a PtdIns(3,4,5)P3 y PtdIns(3,4)P2, en la región C-terminal. Un análisis filogenético muestra que la conservación del dominio C-terminal no catalítico de PDK1 se extiende a lo largo de los metazoos. Las proteínas Pkh de *S. cerevisiae* también contienen el dominio PK en su extremo N-terminal. Las regiones C-terminal no catalíticas de Pkh1 y Pkh2 se encuentran relacionadas entre ellas (poseen un 20% de identidad), y parece que se conservan exclusivamente en ascomicetos. Hasta el momento no se conoce la función de este extenso dominio C-terminal de las Pkh de levadura, ni se ha conseguido demostrar que pueda unir ningún tipo de fosfoinosítido.

Hay crecientes evidencias que apuntan a que determinados esfingolípidos pueden actuar en una vía de señalización en la que intervienen Pkh1/2 así como sus sustratos Ypk1/2. Así, la sobreexpresión de Ypk1 confiere resistencia a la miriocina, un inhibidor de la primera reacción de la síntesis de los esfingolípidos. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de los dominios no catalíticos de Pkh1 y Pkh2 y, en particular, en su posible papel en relación con los esfingolípidos.

Nota: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-11593).

P18r-46

Investigating the role of the yeast Ptc6 phosphatase in the TOR signalling pathway

Carlos Casado, Asier González, Joaquín Ariño y Antonio Casamayor

Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

Type 2C Ser/Thr protein phosphatases (PP2Cs) are a group of evolutionarily conserved monomeric enzymes. In the *S. cerevisiae* genome seven PP2C-encoding genes (*PTC1-7*) are found. Ptc6 is located in the mitochondria, regulates the phosphorylation state of Pda1, a subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, and is also required for efficient stationary phase mitophagy. The *ptc6* mutant is sensitive to rapamycin (a TOR kinase inhibitor), a

phenotype that is also displayed by cells lacking *PTC1*. Since we have recently shown that Ptc1 is required for normal signalling through the TOR pathway, possibly by regulating a step upstream of Sit4/Tip41 function, we decided to investigate the nature of the functional connection between Ptc6 and this pathway. Several evidences show the different mechanism of action of Ptc1 and Ptc6 in regulating the TOR pathway: a) the *ptc1 ptc6* strain is more sensitive to rapamycin than both single mutants, b) cells lacking Ptc6 can recover from the growth arrest induced by rapamycin and c) deletion of *PTC6* can further increase the rapamycin sensitivity of strains lacking *SIT4* or *TIP41*. Genetic studies also indicate that the rapamycin-sensitive phenotype derived by the lack of Ptc6 is not mediated by its role on the regulation of the PDH complex or the mitophagy process. Moreover, transcriptomic analysis shows that *PTC6* mutation dramatically attenuates the transcriptional changes caused by rapamycin, mainly at the level of repressed genes. We propose that the inability to repress transcription of certain genes in response to rapamycin may be the cause of the observed phenotypes.

Note: Supported by grants BFU2008-04188-C03-01(JA) and BFU2009-11593 (AC).

P18r-47

Transcriptional regulation of TM4SF4 by the Farnesoid X Receptor

Elena Pedraz, Cédric Langhi y Joan Carles Rodríguez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

The transmembrane 4 superfamily member 4 (TM4SF4) is a human glycosylated protein that belongs to tetraspanin superfamily. Tetraspanins are able to interact with many other signaling molecules and participate in numerous processes such as cell activation and proliferation, adhesion and motility, differentiation, and cancer. The nuclear receptor Farnesoid X Receptor (FXR) is a ligand-regulated nuclear receptor that plays an important role in the control of bile acid homeostasis. FXR is also implicated in numerous physiological processes as a protective factor of liver and intestine. Using a microarray analysis in a human hepatoma cell line, we have found that a synthetic ligand of FXR, GW4064, upregulates TM4SF4. Reporter assays and qPCR data indicate that this nuclear receptor is able to up-regulate TM4SF4 gene expression in human hepatoma cell lines. We have also shown that this induction is lost when FXR is knocked down by specific siRNA. Accordingly, *in vivo*

studies show an induction of hepatic TM4SF4 expression by GW4064 and cholic acid, a natural FXR activator, treatments in wild type mice, whereas this effect is not observed in FXR deficient mice. Altogether, our results demonstrate that TM4SF4 is a *bona fide* FXR target gene.

P18-48

Increased apoptotic efficacy of lonidamine plus arsenic trioxide combination in human leukemia cells. Reactive oxygen species generation and defensive protein kinase (MEK/ERK, Akt/mTOR) modulation

Eva Calviño Venegas¹, Cristina Estañ Omaña¹, Gloria Pilar Simón García de Mora¹, Pilar Sancho², Carmen Boyano², Jacqueline Bréard³, Elena De Blas¹ y Patricio Aller¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hôpital Paul Brousse, Villejuif (France)

Lonidamine is a safe, clinically useful anti-tumor drug, but its efficacy is generally low when used in monotherapy. We here demonstrate that lonidamine efficaciously cooperates with the anti-leukemic agent arsenic trioxide (ATO, TrisenoxTM) to induce apoptosis in HL-60 and other human leukemia cell lines, with low toxicity in non-tumor peripheral blood lymphocytes. Apoptosis induction by lonidamine/ATO involves mitochondrial dysfunction, as indicated by early mitochondrial permeability transition pore opening and late mitochondrial transmembrane potential dissipation, as well as activation of the intrinsic apoptotic pathway. Lonidamine stimulates reactive oxygen species production, and lonidamine/ATO toxicity is attenuated by antioxidants. Lonidamine/ATO stimulates JNK phosphorylation/activation, and apoptosis is attenuated by the JNK inhibitor SP600125. In addition, lonidamine elicits ERK and Akt/mTOR pathway activation, as indicated by increased ERK, Akt, p70S6K and rpS6 phosphorylation, and these effects are reduced by co-treatment with ATO. Importantly, co-treatment with MEK/ERK inhibitor (U0126) and PI3K/Akt (LY294002) or mTOR (rapamycin) inhibitors, instead of ATO, also potentiates lonidamine-provoked apoptosis. These results indicate that: (i) Lonidamine efficacy is restrained by drug-provoked activation of MEK/ERK and Akt/mTOR defensive pathways, which therefore represent potential therapeutic targets. (ii) Co-treatment with ATO

efficaciously potentiates lonidamine toxicity via defensive pathway inhibition and JNK activation. And (iii) conversely, the pro-oxidant action of lonidamine potentiates the apoptotic efficacy of ATO as an anti-leukemic agent.

P18-49

Efecto de mutaciones en proteínas de la familia Ras en la sensibilidad frente a los tratamientos en cultivos celulares de cáncer de páncreas

Carolina Torres Perales¹, Sonia Perales Romero¹, Rogelio Palomino Morales¹, María José Alejandre Pérez¹, José Iglesias Gómez¹, Octavio Caba², José Carlos Prados³, Antonia Aránega³, Juan Ramón Delgado⁴, Antonio Irigoyen⁴ y Ana Linares Gil¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, Granada, ²Departamento de Ciencias de la Salud. Área de Anatomía. Universidad de Jaén, Jaén, ³Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Granada, Granada, ⁴Servicio de Oncología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) es uno de los cánceres más letales alcanzando un 98% de muertes de los casos estimados para el 2011 y uno de los que presenta una respuesta menor a las terapias convencionales. Todos los esfuerzos se centran en encontrar nuevas terapias más efectivas o nuevas dianas moleculares que permitan aumentar las tasas de supervivencia de esta enfermedad. La mayoría de los cánceres de páncreas tienen un origen ductal y uno de los primeros eventos en la progresión del PDAC es la mutación del oncogén k-ras. Además debido a que la activación por mutación de proteínas Ras se presenta en el 90% de los PDAC, parece razonable considerar que k-ras y el resto de la familia de las proteínas G de membrana podrían jugar un papel importante en la progresión del cáncer de páncreas y podrían constituir nuevas dianas sobre las que actuar en la búsqueda de una respuesta clínica mayor.

El objetivo de estos ensayos es analizar el efecto de las mutaciones en los componentes de la familia Ras en la sensibilidad de las células a los tratamientos con gencitabina y erlotinib, utilizando para ello los mutantes de la línea Panc-1: *T19N* (dominante negativo de RhoA), *G14V* (dominante positivo de RhoA), *S17N* (dominante negativo de H-Ras) y *G12V* (dominante positivo respecto de H-Ras). Además, debido al papel central de la isoprenilación de las proteínas G de membrana en las vías de proliferación, hemos analizado el efecto de la lovastatina sola o en combinación con los dos fármacos anteriores, en

la inhibición de la proliferación en cultivos de células de cáncer de páncreas y en la sensibilización de estas células a los tratamientos anteriores.

P18-50

McpS: the first bifunctional chemoreceptor

José Antonio Reyes Darías¹, Estela Pineda Molina², Jesús Lacal¹, Juan Luis Ramos¹, Juan Manuel García Ruiz², José Antonio Gavira Gallardo² y Tino Krell¹

¹Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, ²Laboratorio de Estudios Cristalográficos, CSIC, Granada

Chemoreceptor mediated signalling is essential for bacteria to adapt to changing to environment conditions. Environmental stimuli are sensed by chemoreceptors, so called methyl-accepting chemotaxis proteins (Mcp), which is typically composed of a periplasmic ligand-binding domain (LBD) and a cytosolic signalling domain. Receptors can be classified according to the size of their LBD into cluster I and II. In this study we have identified a chemoreceptor, termed McpS that mediates chemotaxis specifically toward 6 tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates and butyrate in *Pseudomonas putida*. We report high-resolution structures (1.8 Å) of the McpS-LBD in complex with its cognate ligands, and shows a new protein folding motif for bacterial chemotaxis receptor: the “six-helix bundle” motif, which is a derivation of the classical Tar-like-4 helix bundle motif by straightforward duplication with respect a transversal symmetry axis. We demonstrate furthermore that each 4-helix bundle of McpS contains a ligand binding site. Malate and succinate are bound to the membrane-proximal bundle whereas acetate is bound to the membrane distal bundle. In the structural alignment of both bundles, the binding sites coincide and amino acids in each binding sites are conserved, which is consistent with the notion that both binding sites are of functional relevance. Qualitative and Quantitative chemotaxis assays of the bacterial mutant deficient in *mcpS* and complementation assays demonstrate that McpS is the only chemoreceptor that recognizes Krebs’s cycle intermediates. In summary, the present work describes the molecular characterization of a new class of bifunctional receptors, and opens a new avenue in the field of bacterial signal transduction and molecular recognition.

P18-51

Biological activity of novel ceramide analogues

Josefina Casas Brugulat¹, Fabio M. M. Simbari¹, Luz del Carmen Camacho Castillo¹, María Garrido Martínez¹, Gemma Fabriàs Domingo¹, Antonio Delgado Cirilo² y José Luis Abad Saiz¹

¹RUBAM, Depto. Química Biomédica, Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), Barcelona, ²Unidad de Química Farmacéutica (Unidad Asociada al CSIC), Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

Alterations in the cellular levels of the sphingolipid ceramide, a potent mediator of apoptosis and an inhibitor of cell proliferation, contribute to cancer outcome, progression, and resistance to both chemo- and radiotherapy. The cytotoxic and/or antiproliferative effect of many antitumor strategies is at least partly due to increases in ceramide in a variety of tumor cell lines. Increasing evidence points to important roles of acid ceramidase in cancer development and response of tumors to therapy. Likewise, increasing efforts are being dedicated to the development of acid ceramidase inhibitors as anticancer drugs, either alone or in combination with radio- or chemotherapy as sensitizers to overcome resistance.

The biological activity of new ceramide analogues RBM2-1B/D in two different human adenocarcinoma cell lines, namely lung A459 and colon HCT116, will be described in this communication.

The compounds were tested as inhibitors of several enzymes of sphingolipid metabolism, namely, dihydroceramide desaturase, acidic and neutral ceramidases, acidic sphingomyelinase and glucocerebrosidase, both in intact cells and cell lysates. Moreover, their effect on the cellular sphingolipidome and on the cell fate will be also presented.

P18-52

Papel del supresor de tumores FOXO3a y su relación con β -catenina en la patogénesis de LCM

Clara Aceves Luquero¹, Antònia Obrador-Hevia¹, Príam Villalonga¹, José Rodríguez² y Silvia Fernández de Mattos¹

¹Grupo de Biología Celular del Cáncer. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS). Universitat de les Illes Balears, Palma,

²Hospital Severo Ochoa, Madrid

El linfoma de células del manto (LCM) es un subtipo clínico de linfoma no-Hodking caracterizado por la

translocación cromosómica t(11;14)(q13;q32) que origina la sobreexpresión de Cyt D1. Las alteraciones moleculares que se producen alteran la regulación del ciclo celular y la apoptosis, procesos en los que se encuentra implicado el factor de transcripción FOXO3a actuando como supresor tumoral. Por otro lado se ha publicado que la vía Wnt/ β -catenina tiene implicación en diversas patologías hematológicas, entre ellas el LCM.

Diferentes estudios han descrito la interacción entre FOXO3a y β -catenina en varios modelos tumorales, demostrándose que ambas proteínas actúan como cofactores y regulan mutuamente su actividad transcripcional.

Dado el interés de ambos cofactores en la linfomagénesis hemos querido estudiar la relación de FOXO3a (supresor tumoral) con β -catenina (que actúa como oncogén) en un contexto de LCM. Para ello trabajamos con líneas celulares de LCM y células primarias de pacientes con esta patología. Hemos realizado ensayos de viabilidad con diferentes moduladores de ambas vías de señalización, inmunoprecipitación para estudiar la interacción de los cofactores, separación molecular de núcleos y citoplasma e inmunocitoquímica para discernir la localización celular y subcelular de nuestras proteínas de interés.

P18-53

La inhibición de la proteína quinasa CK2 afecta la respuesta de la vía PI3K/PKB a HB-EGF en células renales humanas HK-2 y 786-O

Estefania Alcaraz¹, Núria Galeano¹, Anton Falqués¹, Jordi Vilardell¹, Eduard Sarró², Maria Plana¹, Anna Meseguer³ y Emilio Itarte¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Fisiopatologia Renal, CIBBIM, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, ³Fisiopatologia Renal, CIBBIM, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

El factor de crecimiento HB-EGF (*heparin binding EGF-like growth factor*) se sintetiza en forma de precursor transmembrana y por proteólisis limitada, catalizada por metaloproteasas de membrana, da lugar a la forma soluble, que interacciona con los receptores ErbB1 y ErbB4, desencadenando la activación de diferentes vías de señalización implicadas en proliferación celular. Se ha descrito que este factor de crecimiento está implicado en algunos tipos de cáncer y en daño renal.

En células humanas derivadas de carcinoma renal de células claras (786-O), hemos observado que HB-EGF provoca una translocación de B-Raf a membranas celulares y también aumenta la asociación a membranas de la subunidad catalítica de la proteína quinasa CK2, que se ha descrito que puede fosforilar B-Raf en Ser446. No obstante, la presencia de inhibidores de CK2 (TBB y TBCA), no afecta significativamente la estimulación de ERK1/2 producida por este factor. Por el contrario, TBB y TBCA inhiben la fosforilación de PKB en Ser473 y, especialmente, en Thr308, y de su sustrato GSK3 β (Ser9) estimulada por HB-EGF, tanto en células 786-O como en células HK-2 derivadas de túbulo proximal normal. En ambas líneas celulares la fosforilación basal de PKB en Thr308 es indetectable, mientras que 786-O presenta fosforilación basal en Ser473. TBB y TBCA no alteran significativamente la fosforilación basal de PKB en Ser473 ni la de GSK3 β (Ser9) en células 786-O.

Los resultados indican que CK2 no afecta la fosforilación basal de PKB en Ser473 específica de 786-O, pero que es necesaria para la activación de la vía PI3K/PKB en respuesta a HB-EGF en HK-2 y 786-O.

Nota: Financiado por BFU2009-10189 del MCINN y FIS PI081351 del Instituto de Salud Carlos III.

P18-54

La proteína quinasa CK2 se sobreexpresa y acumula en núcleo en carcinoma renal de células claras

Jordi Vilardell¹, Thais Cuadros², Albert Garcia-Madrid¹, Carme Mir³, Enric Trilla⁴, Inés de Torres³, Santiago Ramón y Cajal³, María Plana¹, Joan Morote⁴, Anna Meseguer² y Emilio Itarte¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Fisiopatologia Renal, CIBBIM, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, ³Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, ⁴Servei Urologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

La proteína quinasa CK2, constituida por dos subunidades catalíticas (CK2 α/α') y dos subunidades reguladoras (CK2 β), está presente en el núcleo y citoplasma de todas las células eucariotas. CK2 está alterada en algunos cánceres humanos, debido a la sobreexpresión específica de alguna de sus subunidades o alteraciones en su localización intracelular.

El carcinoma renal de células claras (ccRCC) constituye la forma más prevalente y maligna de los tumores renales. En

muestras quirúrgicas de pacientes afectados de ccRCC, que contenían parte sana y parte tumoral del mismo riñón, mediante estudios por western-blot y análisis inmunohistológico de TMA's hemos observado un incremento de CK2 en tumores. En cuanto a la distribución subcelular, en tejido normal CK2 α es mayoritariamente citoplasmática mientras que en tumores incrementa marcadamente en núcleo, con sólo una ligera disminución en citoplasma, lo que indica una sobreexpresión nuclear de CK2 α en tumores. Los cambios en CK2 β son más discretos y su acumulación nuclear en tumores podría ser debida a translocación desde citoplasma, en el que se observa una marcada disminución.

La incidencia de ccRCC parece estar relacionada con la inactivación funcional del gen von Hippel-Lindau (VHL). Utilizando células 786-O, derivadas de ccRCC, deficientes en pVHL, y 786-O transfectadas de forma estable con un vector de expresión pVHL, hemos observado que la presencia de pVHL no disminuye sino que aumenta los niveles de CK2 α , alterando la ratio entre CK2 α /CK2 β .

Los resultados indican la sobreexpresión de CK2 α en carcinoma renal de células claras por un mecanismo que no parece debido a la inactivación de VHL.

Nota: Financiado por BFU2009-10189 del MCINN y FIS PI081351 del Instituto de Salud Carlos III.

P18-55

Función de mutantes de delección del ectodominio de la podocalicina humana

Darío Fernández¹, Inés Sánchez¹, Miguel Pericacho¹, Tomás Fontela², Roberto Parrilla¹ y Matilde Sánchez Ayuso¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, ²Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid

La podocalicina (PODXL) es una proteína perteneciente a la familia CD34, se expresa en una amplia variedad de tejidos y tumores. Debido a su presencia en éstos se le considera un marcador de progresión y malignidad y se sabe que la sobreexpresión en sistemas heterólogos tiene capacidad de adhesión y migración. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar las propiedades de adhesión y migración de las células que expresan PODXL. Para ello preparamos construcciones de PODXL y mutantes de delección del ectodominio ($\Delta 45$, $\Delta 146$ y $\Delta 365$ aa) como proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente y se transfectaron de forma estable en células de ovario de hámster chino. Nuestros resultados muestran que las células que expresan

PODXL, poseen una capacidad de adhesión y migración mayor que las células que no la expresan. La delección de los primeros 45 aminoácidos, poseen propiedades de adhesión y migración mayores que las células que expresan PODXL y en cambio las mutantes $\Delta 146$ y $\Delta 365$, no produjeron aumento de adhesión respecto a las células que no expresaban PODXL, y su capacidad migratoria fue similar a la de las células con PODXL completa. Las variaciones en la velocidad de migración pero no en la capacidad de adhesión, van acompañadas de la activación de Rac-1, proteína de la familia de GTPasas y regulador del citoesqueleto de actina. Podemos concluir que la expresión de PODXL incrementa la capacidad de adhesión y migración, que en el dominio comprendido entre los residuos 45 y 146 reside la capacidad de incrementar la adhesión, que la capacidad de incrementar adhesión y migración reside en diferentes dominios y que la capacidad de aumentar la velocidad de migración tiene lugar a través de la activación de Rac-1.

P18-56

El supresor tumoral FOXO3a es un regulador clave de la proliferación y supervivencia en el linfoma de células del manto

Margalida Serra Sitjar¹, Antònia Obrador Hevia¹, Priam Villalonga¹, José Rodríguez² y Silvia Fernández de Mattos¹

¹Grupo de Biología Celular del Cáncer. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS). Universitat de les Illes Balears, Palma, ²Hospital Severo Ochoa, Madrid

El factor de transcripción FOXO3a es un regulador crucial del destino de las células hematopoyéticas que controla, entre otros procesos, la proliferación, apoptosis y resistencia al estrés oxidativo. FOXO3a tiene un papel central como efector de la vía PI3K/AKT y como supresor tumoral, pero se conoce muy poco de su participación en la biología de linfomas de células del manto (LCM).

En este estudio se ha investigado la expresión y actividad de FOXO3a en un panel de células de LCM y en células primarias derivadas de pacientes. Se ha analizado la expresión y el grado de fosforilación de FOXO3a y de sus dianas, así como el efecto de varios moduladores de la función de FOXO sobre la viabilidad celular y la inducción de apoptosis.

Los resultados indican que FOXO3a está constitutivamente fosforilado y, por tanto, inactivado, en líneas celulares de LCM, y localizado en el citoplasma de las células derivadas de pacientes. El tratamiento con inhibidores de PI3K y AKT, pero no de mTOR, induce la traslocación nuclear de

FOXO3a y su activación, resultados que correlacionan con su papel en la proliferación y supervivencia de las células de LCM. Además, las células con bajos niveles de FOXO3a muestran resistencia a los inhibidores de PI3K y AKT. La reactivación de la función de FOXO con un inhibidor de la exportación nuclear tiene un profundo efecto en la viabilidad de las líneas celulares y de las células derivadas de pacientes, y sinergiza con el fármaco doxorubicina.

En conjunto, nuestros resultados confirman que FOXO3a es un regulador importante de la proliferación y apoptosis en LCM, y sugieren que la reactivación de FOXO3a podría constituir una estrategia terapéutica útil en pacientes de LCM.

P18-57

E2F1 induces the activation of mTOR by promoting the translocation of mTOR to the late endosome vesicle Nathalie Meo-Evoli, Sebastian Real, Lilia Espada, and Albert Tauler

Nathalie Meo-Evoli, Sebastian Real, Lilia Espada y Albert Tauler

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona

During cell proliferation, growth must occur to maintain homeostatic cell size. Here we show that E2F1 is capable of inducing growth by regulating mTOR activity. The activation of cell growth and mTOR by E2F1 is dependent on both E2F1's ability to bind DNA and to regulate gene transcription, demonstrating that a gene induction expression program is required in this process. Unlike E2F1, E2F3 is unable to activate mTOR, suggesting that growth activity could be restricted to individual E2F members. The effect of E2F1 on the activation of mTOR does not depend on Akt. Furthermore, over-expression of TSC2 does not interfere with the effect of E2F1, indicating that E2F1-induced signal pathway can compensate the inhibitory effect of TSC2 on Rheb. Immunolocalization studies demonstrate that E2F1 induces the translocation of mTOR to the late endosome vesicles, which requires the presence of leucine. E2F1 and leucine, or insulin, together affect the activation of S6K stronger than alone suggesting that they are complementary in activating the signal pathway. As a result of these experiments, we suggest two possible mechanisms of E2F1 action. E2F1 could be interacting with the amino acid signaling pathway and potentiating late endosomes formation or, E2F1 could enlarge the endosome vesicles downstream of amino acid signaling. From this study, E2F1 emerges as a key protein

that integrates cell division and growth, which are essential for cell proliferation.

P18e-58

A functional network of the tumor suppressors APC, PTEN, and hDlg that relies on recognition of specific PDZ-domains

Natalia Soledad Sotelo, Miguel Valiente y Rafael Pulido

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia

APC and PTEN are tumor suppressor proteins that bind through their N-termini to the PDZ domain containing-hDlg scaffolding protein. Here, we report that APC and PTEN share other PDZ domain containing-interacting partners, including the MAGI-scaffolding proteins and the MAST family of protein kinases. Mutational analysis revealed that the C-terminal PDZ-binding motifs from APC and PTEN were differentially recognized by distinct PDZ domains. APC bound to the three PDZ domains from hDlg, whereas PTEN mainly bound to PDZ-2/hDlg. This indicates the existence of overlapping but distinct PDZ-domain recognition patterns by APC and PTEN. Furthermore, a ternary complex formed by APC, PTEN, and hDlg was detected, suggesting that hDlg may serve as a platform to bring in proximity APC and PTEN tumor suppressor activities. In line with this, tumor-related mutations targeting the PDZ-2/hDlg domain diminished its interaction with APC and PTEN. Our results expand the PDZ-domain counterparts for the tumor suppressor APC, show that APC and PTEN share PDZ-domain partners but have individual molecular determinants for specific recognition of PDZ domains, and suggest the participation of the tumor suppressors APC, PTEN, and hDlg in PDZ domain interaction networks which may be relevant in oncogenesis.

Molecular, Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla, Sevilla, ²Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, Alicante, ³Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, Sevilla

Los LXR (*Liver X Receptor*) son receptores nucleares de derivados del colesterol (oxisteroles). La activación de los LXR regula multitud de genes relacionados con la homeostasis lipídica. El presente trabajo estudia la regulación transcripcional de los LXR $\alpha\beta$ por distintos activadores/inhibidores de la AMPK, proteína expresada de forma ubicua en las células de mamíferos. Este enzima está involucrado en la respuesta a una gran variedad de estímulos de estrés metabólico, (homeostasis energética). Se analizaron los efectos de activadores de la AMPK, tales como AICAR, metformina, berberina y naringenina, sobre la expresión del ARNm del LXR α . Se observó una activación de la expresión del ARNm del LXR en neutrófilos y monocitos humanos, y potenció la acción de ligandos sintéticos y naturales. Este efecto positivo se observó así mismo en otras dianas de los LXR: ABCA1, ABCG1 y SREBP1c. Su efecto activador era revertido por inhibidores específicos de la AMPK (8 Br-AMP, componente C). Describimos que los activadores de AMPK, eran capaces de producir la fosforilación de AMPK en neutrófilos y monocitos humanos, así como, la expresión del ARNm de AMPK α 2, subunidad catalítica del enzima. En anteriores resultados nuestro grupo evidenció que AMPK inhibe el estrés oxidativo. El hecho que esta situación metabólica reduzca la expresión del LXR podría conectarse con el efecto potenciador del AMPK descrito en la presente comunicación. Los resultados presentados sugieren que la AMPK esta implicada en la regulación de los receptores nucleares LXR en neutrófilos y monocitos humanos, y por tanto en la homeostasis lipídica. Este hallazgo podría ser relevante para la descripción de una nueva diana para la realización de nuevos fármacos contra la aterosclerosis.

P18-59

La activación de la AMPK estimula la expresión de los receptores LXR, de los transportadores ABC y SREBP1c en células fagocíticas humanas

Gonzalo Alba¹, María Edith Reyes¹, José Martín-Nieto², Juan Jiménez³, Elizabeth Pintado³ y Francisco Sobrino³

¹Departamento de Bioquímica Médica y Biología

P18-60

The role of importin isoforms in PTEN nuclear accumulation

Miriam Stumpf, Anabel Gil y Rafael Pulido
Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia

PTEN is a phosphatase that exerts important tumor suppressor functions, both in the cytoplasm and in the nucleus, and the nuclear/cytoplasmic distribution of PTEN is a key mechanism to regulate PTEN functions. In fact, lack of nuclear PTEN is considered as a biological marker for more aggressive disease in various cancer types. PTEN

nuclear import depends on the small GTPase Ran, hinting at the canonical protein import pathway as a major mechanism employed for PTEN nuclear accumulation. We have analyzed which importin isoforms are responsible for the nuclear import of PTEN. PTEN proteins (WT and mutations) were overexpressed in cells with importin isoforms, and PTEN nuclear localization was analyzed by immunofluorescence. We also analyzed by co-immunoprecipitation experiments the physical interaction between PTEN and importin isoforms. From these experiments, we conclude that importin $\beta 1$, $\alpha 3$ and $\alpha 7$ favor PTEN nuclear localization. To further analyze the role of importin $\alpha 3$ and $\alpha 7$ in PTEN nuclear import, we generated individual and combined binding pocket mutants of these two importin α isoforms, replacing the WXXXN motifs by AXXXA, and tested their effect on PTEN nuclear localization. Our preliminary results suggest that the minor binding pockets of importin $\alpha 3$ and $\alpha 7$ play a predominant role in PTEN nuclear entry.

P18-61

Treatment with Rosiglitazone reverts the glucose homeostasis impairment caused by the in vivo selective activation of JNK in β pancreatic cells

Jordi Lanuza Masdeu¹, Maria Isabel Arévalo¹, Cristina Vila¹, Belén Nadal², Albert Barberà², Ramón Gomis² y Carme Caelles¹

¹*Cell Signaling Group, Molecular Medicine Program, IRB Barcelona. Biochemistry and Molecular Biology Department, Pharmacy School, University of Barcelona, Barcelona,* ²*Laboratory of Diabetes and Obesity, IDIBAPS-Hospital Clínic, University of Barcelona. CIBERDEM, Barcelona*

It has been described that the JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) activity is abnormally increased in several tissues in conditions of diabetes type 2 and the activation of the pathway interferes in the insulin signaling and the β pancreatic cells function, a part from participating in the autoimmune destruction of these cells in type 1 diabetes.

With the aim of expanding the knowledge of the in vivo JNK pathway regulation and, in particular, in relation to diabetes, we have generated a transgenic mice that allows us to activate JNK in a tissue specific manner. We have designed a conditionally expressed transgene –depending on the Cre recombinase– for MKK7D (Mitogen Kinase Kinase 7D), a constitutively active form for the MAP2K (Mitogen Activated 2 Kinase) that phosphorylates and activates JNK specifically.

The mice that express MKK7D in the β pancreatic cells

present a defective glucose homeostasis that includes a decreased glucose tolerance and insulin secretion. We have checked that this defect is not related to a morphostructural affection of the pancreatic islets but to a functional alteration of the β cells.

Treatment with Rosiglitazone, which is an insulin sensitizer drug in the thiazolidinedione class of drugs, achieved to revert the phenotype, partly by sensitizing the peripheral tissues to insulin and partly by increasing insulin secretion.

P18-62

Pro-inflammatory SAPK pathways are inhibited by ligand activated LXR

Kader Cavusoglu y Carme Caelles

Cell Signaling Group, Molecular Medicine Program, IRB Barcelona, Barcelona

Increasing amount of evidence states a close link between metabolism and immunity. Certain nuclear receptor pathways (particularly PPARs and LXRs) and stress activated protein kinase (SAPK) pathway are both shown to be important regulators of glucose and lipid metabolism as well as immune response. Since they have opposite effects on these processes, the existence of a biologically relevant negative cross-talk between these signaling pathways is very likely. As an example of this interaction, we have previously shown that thiazolidinediones, which are synthetic PPAR γ ligands used as insulin-sensitizing agents in medicine for treatment of type 2 diabetes, mediate their hypoglycemic action by inhibition of the JNK cascade. In addition to PPAR γ , we have extended our research to other members of the NR family, analyzing their ability to inhibit the activation of the JNK and p38 pathway. Our data led us to focus on LXRs which has the strongest inhibitory effect. We showed that the effect of the ligand is receptor specific by studies on LXR double knockout mice. And also our results indicate that MKP1, a phosphatase that is known to inhibit JNK activity, is not responsible of this effect. According to our data, the inhibition by these NRs seems to be mediated by a transcriptionally-dependent mechanism. Therefore gene products mediating such interference will be potentially relevant in biomedicine, particularly in the context of chronic inflammatory diseases such as insulin resistance and type 2 diabetes or atherosclerosis.

P18-63

A comparative analysis of interphase and mitotic human γ TuRC re-defines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8

Neus Teixidó-Travessa¹, Judit Villén², Cristina Lacasa³, M. Teresa Bertran⁴, Marco Archinti³, Stephen P Gygi², Carme Caelles⁵, Joan Roig⁴ y Jens Lüders³

¹Cell and Developmental Biology Programme and Molecular Medicine Programme, IRB Barcelona, Barcelona, ²Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston (USA), ³Cell and Developmental Biology Programme, IRB Barcelona, Barcelona, ⁴Molecular Medicine Programme, IRB Barcelona, Barcelona, ⁵Molecular Medicine Programme, IRB Barcelona, and Department of Biochemistry and Molecular Biology (Pharmacy), Universitat de Barcelona, Barcelona

The γ -tubulin complex is a multi-subunit protein complex that nucleates microtubule polymerization. γ -Tubulin complexes are present in all eukaryotes, but size and subunit composition vary. In *Drosophila*, *Xenopus*, and humans large γ -tubulin ring complexes (γ TuRCs) have been described, which have a characteristic open ring-shaped structure and are composed of a similar set of subunits, named γ -tubulin, GCPs 2-6, and GCP-WD in humans. Despite the identification of these proteins, γ TuRC function and regulation remain poorly understood. Here we establish a new method for the purification of native human γ TuRC. Using mass spectrometry of whole protein mixtures we compared the composition of γ TuRCs from nonsynchronized and mitotic human cells. Based on our analysis we can define core subunits as well as more transient interactors such as the augmin complex, which associates specifically with mitotic γ TuRCs. We also identified GCP8/MOZART2 as a novel core subunit that is present in both interphase and mitotic γ TuRCs. GCP8 depletion does not affect γ TuRC assembly but interferes with γ TuRC recruitment and microtubule nucleation at interphase centrosomes without disrupting general centrosome structure. GCP8-depleted cells do not display any obvious mitotic defects, suggesting that GCP8 specifically affects the organization of the interphase microtubule network.

P18-64

N-glycosylation of human melanocortin 1 receptor. Effects on intracellular trafficking and functional coupling

Cecilia Herraiz, Celia Jiménez-Cervantes y José Carlos García-Borrón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia, Espinardo, Murcia

The melanocortin 1 receptor (MC1R), a key determinant of skin type, is a Gs protein-coupled receptor whose signaling through the cAMP and ERK pathways is critical for melanocyte proliferation and differentiation. MC1R has two N-glycosylation targets, Asn15 and Asn29 in its extracellular N-terminus and is a glycoprotein with unusual sensitivity to endoglycosidase H (EndoH). The occupancy and functional importance of each glycosylation sequon not known. We analyzed the ligand binding, functional coupling and trafficking properties of glycosylation-deficient mutants. We also compared the function of wild type (WT) MC1R in cell lines defective in specific N-glycosylation steps. Finally, we analyzed the effect of pharmacologic interference with glycan addition or trimming on the function of endogenous MC1R in melanoma cells. We show that MC1R is N-glycosylated at both Asn15 and Asn29, with structurally different EndoH-sensitive high-mannose or hybrid type glycans. N-glycosylation is not necessary for high affinity agonist binding or functional coupling but has a strong effect on the availability of MC1R molecules on the plasma membrane, by a combination of improved forward trafficking and decreased internalization. However, whereas glycosylation of the 15NST17sequon is dispensable, occupancy of the 29NQT31 site is required for normal plasmamembrane density. MC1R variants exhibit different degrees of glycosylation without a simple correlation with their functional status or intracellular trafficking, but their sensitivity to EndoH is comparable with WT. Thus EndoH cannot be used to assess trafficking of MC1R variants. Our data underscore exceptions for major rules concerning the effects of Pro residues on N-glycosylation and the resistance to EndoH of mature glycoproteins.

P18-65

Gq protein induces mitochondria fusion

C. Benincá, A. Freitas y Anna M. Aragay

Institut de Biologia Molecular de Barcelona. CSIC. Parc Científic, Barcelona

The classical view of GPCRs and G proteins has given major emphasis in the signaling that occurs at the plasma

membrane. But lately our view of the cellular location of these proteins is changing. Several studies have provided evidence of the presence of different components of the signaling machinery in other cellular compartments. As so, some GPCRs, have been detected at the nuclear membrane, as is the case of the receptors for endothelin ETaR and ETbR in cardiomyocytes or the receptor purinergic P2Y that localizes at the mitochondrial membranes. As for heterotrimeric G proteins, both G α i and G α 12 proteins have been found at the mitochondria. During our study we discovered the presence of G α q at the mitochondria. We performed fractionation (confirmed by MS), immunofluorescence studies to demonstrate that the endogenous G α q is present at the inner membrane of the mitochondria of NIH3T3 cells and cardiac tissue. Particularly interested is the fact that the over-expression of G α q induces a change in the morphology of mitochondria. Mitochondria appear elongated. On the other hand G α q/G α 11 (-,-) MEF cells present mitochondria fragmented. In Mtf 2 (-,-) MEF cells overexpression of G α q induces fusion. When MEF cells are treated with CCCP or express DRP1, mitochondria are fragmented. The presence of G α q protects against fission. So G α q could be playing a role in the fusion or fission of mitochondria.

P18-66

A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code

Eric Aragón¹, Nina Goerner¹, Alexia Zaromytidou², Qiaoran Xi², Albert Escobedo¹, Joan Massagué³ y Maria Macias⁴

¹Institute for Research in Biomedicine Barcelona, Barcelona, ²Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York (USA), ³Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York and Howard Hughes Medical Institute (HHMI), New York (USA), ⁴Institute for Research in Biomedicine Barcelona and ICREA, Barcelona

When directed to the nucleus by TGF- β or BMP signals, Smad proteins undergo cyclin-dependent kinase 8/9 (CDK8/9) and glycogen synthase kinase-3 (GSK3) phosphorylations that mediate the binding of YAP and Pin1 for transcriptional action, and of ubiquitin ligases Smurf1 and Nedd4L for Smad destruction. Here we demonstrate that there is an order of events—Smad activation first and destruction later—and that it is controlled by a switch in the recognition of Smad phosphoserines by WW domains in their binding partners. In the BMP pathway, Smad1 phosphorylation by CDK8/9 creates binding sites for the

WW domains of YAP, and subsequent phosphorylation by GSK3 switches off YAP binding and adds binding sites for Smurf1 WW domains. Similarly, in the TGF- β pathway, Smad3 phosphorylation by CDK8/9 creates binding sites for Pin1 and GSK3, then adds sites to enhance Nedd4L binding. Thus, a Smad phosphoserine code and a set of WW domain code readers provide an efficient solution to the problem of coupling TGF- β signal delivery to turnover of the Smad signal transducers.

P18-67

Role of Cmk1 in *S. pombe* cell cycle

M.E. Cisneros-Barroso, A. Gómez-Hierro, A. Sánchez-Marinas, D. Giménez-Zaragoza, N. de Olano y R. Aligué

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona. Institut Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona

Cmk1 is a calcium/calmodulin-dependent kinase. Overexpression of the constitutively active Cmk1 (T192D) causes cell cycle arrest *in vivo* and it works together with morphological defects (Rasmussen, 2000). It has been published that mRNA levels of *cmk1* peaks near G1/S phase (Rasmussen, 2000). In order to correlate mRNA to protein, the protein levels were monitored during the cell cycle and no changes were found. FACS analysis was developed in order to determine in which phase cells were arrested when *cmk1-T192D* is overexpressed and they arrest in G1/S. The activity of Cmk1 depends on Calmodulin (Rasmussen, 2000). Calmodulin (CaM) plays an important role in controlling cell proliferation in eukaryotic cells (Rasmussen and Means, 1989). Spores expressing a disrupted form of CaM can not complete cell cycle because they do not have enough levels of CaM in G1 to complete proliferation. Also, in CHO cells it has been described that CaM levels increase during G1/S suggesting that CaM is required for DNA synthesis during S phase (Rasmussen and Means, 1989). As Cmk1 activity is dependent on CaM and Cmk1 protein levels are constant, it is reasonable to think that the activity of Cmk1 may change during the cell cycle in response to CaM binding. In order to confirm this hypothesis, we are currently analyzing the binding between these proteins and the activity of Cmk1 during the cell cycle.

P19. Transgénesis en Mamíferos

P19-1

Modelos de ratones transgénicos para C3G con expresión específica en plaquetas revelan un nuevo role de C3G en coagulación plaquetaria a través de su actividad GEF

Sara Gutierrez-Herrero¹, Vera Maia¹, Javier Gutierrez-Berzal¹, Consuelo González-Manchón², Miguel Pericacho², María Arechederra³, Almudena Porras³ y Carmen Guerrero¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca - CSIC, Salamanca, ²Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid

C3G es GEF de Rap1, una proteína de la familia Ras muy abundante en plaquetas. Específicamente, la isoforma Rap1b participa en aspectos críticos de la función plaquetaria a través de la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Dado que la activación de Rap1 mediada por C3G juega importantes papeles en adhesión en muchos tipos celulares, nuestra hipótesis es que C3G podría intervenir en las funciones de agregación y coagulación plaquetaria reguladas por Rap1. Para abordar esta cuestión, hemos generado líneas de ratones transgénicos para C3G y C3GDCat (un mutante deleciónado en el dominio catalítico) donde ambos transgenes se expresan bajo el promotor del gen PF4, exclusivo de megacariocitos y plaquetas. Ambos transgenes se expresan (RNA y proteína) tanto en megacariocitos como en plaquetas y no modifican el número de plaquetas en sangre periférica. Estudios in vivo (ensayos de sangrado en cortes de cola) e *in vitro* (citometría de flujo, agregometría) indican que C3G juega un papel importante en hemostasia. Así, los animales transgénicos para C3G muestran tiempos de sangrado significativamente más cortos que los animales control, mientras que los mutantes C3GDCat presentan una notable diátesis en comparación con sus hermanos silvestres. Además, C3G incrementa la activación plaquetaria inducida por diferentes agonistas como PMA, trombina, ADP y colágeno. Este efecto de C3G está probablemente mediado por su efector Rap1, ya que la activación y la agregación plaquetaria está claramente reducida en plaquetas transgénicas para C3GDCat. Estos resultados sugieren un nuevo papel de C3G como regulador de la función plaquetaria y abren nuevas perspectivas sobre C3G como una posible diana terapéutica en trastornos trombóticos.

P19-2

La carencia del receptor de IGF de tipo I (IGFIR) en el epitelio de las vías respiratorias del ratón es prescindible para el desarrollo pulmonar

Icía P. López García y José G. Pichel
Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR). Fundación Rioja Salud, Logroño

Al receptor de IGF (*Insulin-like Growth Factors*) de tipo I (IGFIR) se le atribuyen múltiples funciones en el pulmón. Está implicado en el desarrollo pulmonar normal y en patologías respiratorias relevantes, como la reparación de lesiones, fibrosis y cáncer de pulmón. Los ratones deficientes de IGFIR, y de su ligando IGF1, presentan deficiencia respiratoria al nacer causada por hipoplasia y colapso (atalectaxis) pulmonar. Además, la reducción en la expresión o señalización de IGFIR confiere resistencia al daño de las vías respiratorias y protege contra la fibrosis y supuestamente la oncogénesis pulmonar. Para determinar el papel de IGFIR en el compartimento epitelial de las vías respiratorias, hemos generado ratones mutantes condicionales de IGFIR en el epitelio pulmonar, cruzando ratones transgénicos *CCSPCre* que dirigen la recombinasa a las células de Clara, un tipo celular mayoritario del epitelio bronquiolar y precursor de células ciliadas y de otras células del epitelio respiratorio, con ratones *Igf1rflox/flox*. El análisis del DNA genómico por PCR de los ratones dobles transgénicos *CCSPCre/Igf1rflox/flox* adultos demuestra la deleción parcial de *Igf1r* en el pulmón y en la tráquea, pero no en otros tejidos analizados. Estos animales presentan un fenotipo normal y son fértiles, y el estudio preliminar de sus pulmones tampoco ha revelado alteraciones en su tamaño, morfología e histología. Estos datos demuestran que la carencia de IGFIR en las células de Clara y sus derivadas epiteliales en el ratón no es imprescindible ni para el desarrollo pulmonar ni para la función respiratoria. Sin embargo, esperamos que este modelo animal contribuya a determinar la implicación de IGFIR en la regeneración del epitelio respiratorio dañado, fibrosis y tumorigénesis pulmonar.

P20. Transportadores de Membrana

P20-1

Estudio proteómico del mutante *trk1,2* de *Saccharomyces cerevisiae* en condición limitante de potasio

Samuel Gelis¹, Inmaculada Redondo², Casimiro Barbado¹, Jesús Jorriñ² y Jose Ramos¹

¹Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba, Córdoba, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Vegetal y Agroforestal, Universidad de Córdoba, Córdoba

El estudio de la homeostasis de cationes resulta ser un reto muy grande en la comprensión de la fisiología de las células. Los cationes, especialmente el potasio, son muy importantes para las distintas funciones celulares tal como el mantenimiento del potencial de membrana, el pH y volumen intracelular y la actividad de enzimas. La levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, gracias a la gran cantidad de estudios realizados, tal como la existencia de un gran número de mutantes disponibles, nos permite realizar avances en el conocimiento de la homeostasis del potasio. El sistema de transporte de potasio de *S. cerevisiae* está compuesto por un sistema de baja afinidad observado en condiciones no limitantes de potasio, y de un sistema de alta afinidad con una Km del orden del mM. Dos transportadores, codificados por los genes *TRK1* y *TRK2*, han sido descritos en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Navarrete et al., 2010), siendo *TRK1* el más importante. En un trabajo previo se comparo el perfil proteómico del mutante *trk1/trk2* en condición no limitante de potasio en distintas fases de crecimiento (Curto et al., 2010) y en ayuno de potasio (datos no publicados). Se ha observado mediante 2D/MS variaciones, tanto entre mutantes, como entre fases de crecimiento, principalmente en enzimas de la ruta glicolítica y de la fermentación. En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos en condición limitante de potasio (5 mM). El perfil proteómico fue comparado mediante geles bidimensionales en dos condiciones: en crecimiento exponencial y en fase estacionaria. El análisis demostró diferencias significativas tanto entre las cepas como entre las fases de crecimiento.

Nota: Agradecimiento: Trabajo apoyado por los proyectos GEN2006-27748-C2-2-E/SYS (SysMo ERA-NET) y BFU2008-04188-C03-03.

P20r-2

Diversidad en las respuestas a estrés abiótico en diferentes cepas de *Debaryomyces hansenii* y su relación con las características de la membrana plasmática

Carmen Michán¹, María del Carmen Álvarez², José Luis Martínez², Fernando Calero², Hana Sychrova³, Martina Turk⁴ y José Ramos²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, Córdoba, ²Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba, Córdoba, ³Departamento de Transporte a través de Membranas. Instituto de Fisiología. Academia de Ciencias de la República Checa, Praga (República Checa), ⁴Departamento de Biología. Universidad de Liubliana, Liubliana (Eslovenia)

Debaryomyces hansenii es una levadura osmo-, xero- y halotolerante que posee gran interés en investigación básica y aplicada debido a sus peculiares características. Se trata de una especie muy heterogénea con un metabolismo muy versátil que incluye, por ejemplo, actividades lipolíticas y proteolíticas, gran diversidad de utilización de carbohidratos y capacidad para desarrollarse en ambientes contaminados con metales tóxicos o ambientes salinos. Merece la pena señalar que, aunque el genoma de *D. hansenii* ha sido secuenciado y anotado, hay una carencia importante de herramientas genéticas y moleculares que frenan en parte el desarrollo de la investigación en este organismo. En este trabajo se han caracterizado diversas cepas aisladas tanto de humanos como de distintos alimentos. Se han relacionado sus características fisiológicas y bioquímicas con las propiedades de la membrana plasmática incluyendo análisis de resistencia a varios tipos de estrés abiótico (iónico, oxidativo, osmótico, etc.), composición lipídica de la membrana plasmática, potencial de membrana relativo y contenido en ROS y en glutatión. Los resultados indican que las distintas cepas no presentan un comportamiento generalizable en cuanto a las respuestas a estrés, aunque las cepas de origen humano fueron, en general, más resistentes que las aisladas de alimentos.

Nota: Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BFU2008-04188-C03-03 (Ministerio de Ciencia e Innovación) (JR).

P20r-3

Las proteínas AAA mitocondriales y su posible papel en la homeostasis de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*

Rito Herrera¹, David Canadell², Lina Barreto², Leda Pedelini³, Noelia Morales-Prieto¹, Ulises Santana¹, Lynne Yenush³, Joaquín Ariño² y José Ramos¹

¹Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba, Córdoba, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, ³Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Valencia

La familia de proteínas AAA (ATPasas asociadas con diferentes actividades celulares) agrupa proteínas con un dominio común ATPasa con funciones diversas. En *S. cerevisiae*, el complejo *YTA10-12* (anclado en la membrana mitocondrial interna y con su unidad catalítica expuesta hacia la matriz) e *YTA11* (anclado en la membrana mitocondrial interna y con su unidad catalítica expuesta en el espacio intermembranal) regulan el ensamblaje y degradación de proteínas de membrana no plegadas.

Una búsqueda para identificar nuevos genes implicados en la homeostasis de potasio permitió identificar *YTA10* (*AFG3*) como un gen implicado en la tolerancia a drogas catiónicas: espermina, tetrametilamonio e higromicina B. Este mutante crece deficientemente en concentraciones limitantes de potasio (por ejemplo 1mM) y presenta defectos en el transporte de Rb⁺. Además, la expresión ectópica de *TRK1* rescata completamente la sensibilidad a cationes tóxicos del mutante *afg3*. Sin embargo, no hay cambios en la expresión endógena del mRNA que codifica *TRK1*, sugiriendo una regulación post-transcripcional. Dada la relación entre *AFG3* y los demás componentes (*YTA11* e *YTA12*) ampliamos nuestro estudio a estos genes. Las cepas *yta11* son también sensibles a las citadas drogas, tienen defectos de crecimiento en bajo potasio y en el transporte de Rb⁺, mientras que el mutante *yta12* crece normalmente en bajo potasio y el transporte de rubidio y su crecimiento en espermina son similares a los de la cepa control. Estos datos ponen de manifiesto funciones hasta ahora desconocidas en miembros de esta importante familia de ATPasas.

Nota: Financiado por los proyectos BFU2008-04188-C03-01-02 y 03 (JA, JR, LY) (MICINN); EUI2009-04147 (JA) y EUI2009-04153 (JR) (SysMo2) y ACOMP/2011/024 (LY) (Generalitat Valenciana).

P20-4

La IL-10 aumenta la recaptación de serotonina en células Caco-2

Eva Latorre¹, Marta Castro¹, Laura Grasa¹, Santiago García², Belén Gros², Raquel Vicente², Fernando Gomollón³, José Emilio Mesonero¹ y Ana Isabel Alcalde¹

¹Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ²Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, ³Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza

La serotonina (5-HT) es un neuromodulador importante en la fisiología gastrointestinal. La señalización de 5-HT depende de su disponibilidad, determinada por el transportador, SERT. Se ha demostrado que en patologías inflamatorias crónicas (*Inflammatory Bowel Diseases*) la 5-HT está incrementada. Recientes estudios concluyen que los factores proinflamatorios, como el LPS o el TNF α , inhiben SERT. Sin embargo, el efecto de factores antiinflamatorios como la IL-10, permanece inexplorado. Por ello el objetivo del presente trabajo ha sido determinar si la IL-10 afecta SERT, y de ser así, el mecanismo implicado. Para llevar a cabo el estudio, se ha utilizado la línea celular enterocitaria Caco-2. Los resultados obtenidos muestran que la IL-10 incrementa significativamente la actividad de SERT. Este efecto se produce tras 6 horas de tratamiento a alta concentración, pero desaparece tras 1 día de tratamiento. Al analizar la expresión molecular, se observa que la IL-10 no altera los niveles de RNAm de SERT, ni la expresión de proteína total, sin embargo produce un aumento de la expresión de SERT en la membrana apical, que explicaría el aumento del transporte de 5-HT. En cuanto a la vía de señalización intracelular implicada, los resultados parecen indicar que la vía PI3-Kinasa/Akt podría mediar el efecto de la IL-10 sobre SERT. Estos resultados parecen confirmar la alteración e implicación del sistema serotoninérgico intestinal en la respuesta inflamatoria, y sugieren que la modulación de SERT y con ello, la regulación de los niveles de 5-HT, podrían desempeñar un papel importante en patologías inflamatorias.

Nota: Proyecto financiado por el MCINN (BFU2010-18971) y el Gobierno de Aragón (Proyecto B61). Eva Latorre es becaria predoctoral del Gobierno de Aragón (B105/11).

P20-5

Adenosine A2A receptor modulates CNT3 activity on biliary epithelia

Valeria Godoy¹, Jesús M. Bañales², Juan F. Medina² y Marçal Pastor-Anglada¹

¹Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine, University of Barcelona (IBUB) and CIBER EHD, Barcelona,

²Molecular Genetics Group, Department of Gene Therapy and Hepatology, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra and CIBER EHD, Pamplona

The purinome has been defined as the molecular network responsible for the biological effects of the extracellular adenosine and its metabolites. The protein machinery implicated consists of purinergic receptors, classified as P1 and P2, ectonucleotide-metabolizing enzymes, and nucleoside transporters: concentrative (CNT) and equilibrative (ENT). Notably, these elements play tightly concerted actions under physiological conditions. As a whole and not singularly, they trigger, maintain and terminate the purinergic signalling. The aim of this work was to establish and to characterize in a rat model of cholangiocyte (NRC), the presence and activity of the nucleoside transporters and the P1 receptors, describing the cross-talk between these elements of the purinome. Our results determined that almost all nucleoside uptake activity was concentrative, and mainly located at the apical domain. The inhibition profiles showed that the concentrative activity corresponded to CNT2 and CNT3, which have the best adenosine transport capacity. The study of P1 receptors demonstrated the presence of A1, A2A and A2B, and A2A was the only that exerted a direct modulation of the CNT3 activity. This effect was mediated by an intracellular cAMP increase and apical trafficking of CNT3, which is consistent with the activation of the classic secretion pathway of cholangiocytes. These results confirm the presence of purinome elements in NRC and anticipated a role of adenosine in the physiopathology of the biliary epithelia.

P21. Regulación de la Expresión Génica y Dinámica del Genoma

P21-1

El estudio de la regulación de la expresión génica por la quinasa humana VRK1 revela su papel esencial en el sistema neurológico

Alberto Valbuena y Pedro A. Lazo

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca - CSIC, Salamanca

La quinasa humana *VRK1* (*Vaccinia-Related Kinase 1*) es un gen de respuesta temprana esencial para la expresión de ciclina D1 y la división celular. La supresión de *VRK1* con RNA de interferencia produce defectos en proliferación y parada de ciclo celular.

VRK1 fosforila y activa a los factores de transcripción p53, ATF2, c-Jun y CREB. *VRK1* incrementa la actividad de los promotores de CDK2 y survivina, y aparece en complejos de la maquinaria de transcripción.

Recientemente se ha encontrado una mutación en *VRK1* que causa atrofia muscular espinal infantil con hipoplasia pontocerebelosa, una enfermedad neurodegenerativa que evidencia el papel esencial de *VRK1* en desarrollo y mantenimiento del sistema neuronal.

En este trabajo estudiamos la regulación de la expresión génica por parte de *VRK1* suprimiendo su expresión con RNA de interferencia y estudiando los cambios en la expresión génica de todos los genes humanos conocidos mediante el chip de *Affymetrix Human Gene 1.0 ST array*.

Hemos validado por qRT-PCR 9 de los 13 genes que disminuyen su expresión de forma significativa como consecuencia de la supresión de *VRK1*. Seis de ellos tienen funciones esenciales en el sistema neurológico, como exocitosis de vesículas sinápticas en cerebro (*Lin7c* y *Syt11*), transducción de señales en sistema nervioso (*NCDN*), guía de axones y crecimiento neuronal (*DPYSL2*), transporte de cationes en neuronas (*SLC12A8*) e incluso se relacionan con cambios neurodegenerativos en encefalopatías (*SCRG1*). Además, varios de estos genes se relacionan con esquizofrenia (*Syt11* y *DPYSL2*), anomalías en desarrollo neurológico (*DPYSL2*) y defectos neurológicos (*SLC12A8*).

Estos resultados evidencian el papel esencial de *VRK1* en el desarrollo neurológico y el correcto funcionamiento del sistema nervioso.

P21-2

CpG methylation of tudor-domain containing 9 (TDRD9) promoter

Macarena Guijo Molero¹, María Ceballos-Chávez¹, Manel Esteller² y José Carlos Reyes Rosa¹

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Sevilla, ²Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona

Tudor-domain containing 9 (TDRD9) protein is a member of the RNA helicase family, which has an ATPase/DExH helicase and a tudor domain. This tudor domain has been suggested to be involved in a TDRD9-PIWI association.

TDRD9 is essential for piRNAs-mediated silencing of Line-1 retrotransposon in the mouse male germ line. Although it has been shown that *tldr9* mutation causes Line-1 DNA demethylation and transposase expression that lead to male sterility due to a meiotic failure, the mechanism by which this happens remains unknown. Consistently with its role in germ line, TDRD9 expression has been mainly detected in testes and oocytes. It has been recently described that PIWI proteins are up regulated in some tumours, suggesting a role of piRNA metabolism proteins in cellular transformation and cancer. Interestingly, according to this data, we have found that TDRD9 is expressed in a subset of lung adenocarcinoma cell lines.

TDRD9 gene has a CpG island in the promoter. We have analyzed the DNA methylation pattern of this CpG island in different cell lines expressing or not *TDRD9* gene.

P21-3

Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) deaminates tri-methylated lysine 4 in histone H3

Nicolás Herranz¹, Natàlia Dave², Víctor Lorenz-Fonfría³, Alba Millanes-Romero¹, Ricardo Gutiérrez⁴, Celia Jerónimo⁵, Luciano Di Croce⁵, Antonio García de Herreros² y Sandra Peiro²

¹Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, ²Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, ³Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Barcelona, ⁴IMIM, Barcelona, ⁵CRG, Barcelona

Methylation of lysine K4 (K4) within histone H3 has been linked to active transcription and is removed by LSD1 and the JmjC-domain-containing proteins by amino-oxidation or hydroxylation, respectively. Here we describe the deamination catalyzed by Lysyl oxidase-like 2 protein (LOXL2) as a novel chemical mechanism for H3K4 modification. Infrared spectroscopy and mass spectrometry

analyses demonstrated that recombinant LOXL2 specifically deaminates tri-methylated H3K4. Moreover, LOXL2 activity is linked with the transcriptional control of *CDH1* gene, suggesting that LOXL2 mediates gene expression by regulating H3K4 deamination. These results reveal a new H3 modification and provide a novel mechanism for H3K4 demethylation.

P21-4

Regulación de la expresión de enzimas implicados en la biosíntesis de prostanoïdes por los receptores nucleares LXR y RXR en macrófagos

Paloma Guillem Llobat y Miguel Ángel Íñiguez Peña

Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid

Los LXR son receptores nucleares que forman heterodímeros con receptores RXR. La activación de los LXR/RXR puede darse por unión de ligandos de LXR como los oxisteroles o el TO901317, así como por la unión de ligandos de RXR, como el ácido retinoico 9-*cis*. Además de participar en la regulación del metabolismo del colesterol, recientemente se ha descrito que los LXR pueden ejercer acciones antiinflamatorias. En este trabajo hemos estudiado el efecto de la activación de LXR sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de prostanoïdes en macrófagos de ratón. La familia de los prostanoïdes incluye a las prostaglandinas (PG) y a los tromboxanos (TX), potentes mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico tras la acción de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y distintas PG y TX sintasas. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de la expresión, tanto de la COX-2 como de la mPGES-1, tras la activación de macrófagos por LPS, se ve reducida en células tratadas tanto con ligandos de LXR como con ligandos de RXR. Esto tiene como consecuencia una disminución en la producción de prostanoïdes por estas células. Por otro lado, hemos observado un aumento en la expresión basal de la COX-1 en macrófagos tras el tratamiento con ligandos del RXR, pero no con ligandos de LXR, que tiene lugar a nivel transcripcional. Estos resultados ponen de relieve la regulación diferencial de la expresión de ciertos enzimas implicados en la síntesis de prostanoïdes en macrófagos por los ligandos de los receptores nucleares LXR o RXR. Dada la importancia de los prostanoïdes en el proceso inflamatorio, el estudio de las acciones de los LXR/RXR en la regulación de su producción, contribuye a aportar nuevos datos sobre el potencial antiinflamatorio de estos receptores.

P21-5

Molecular characterization of the interaction between HMG proteins BRAF35 and iBRAF

Gonzalo Arribas Rodríguez, María Ceballos Chávez y José Carlos Reyes Rosa
CABIMER-Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine, Sevilla

The so called HMG20B/BRAF35 protein is a member of the High Mobility Group B DNA binding proteins. It has been reported to be present in two complexes, the BRCA-2 complex and also associated to LSD1-CoREST. Here we focus on the second one, which functions as a neuronal gene repressor in non-neuronal tissues. Although BRAF35 seems to be critical for the function of the LSD1-CoREST complex, its role still remains unknown. HMG20A/iBRAF is a homologue of BRAF35 that shows opposite expression patterns. As members of the HMG family, both proteins share a DNA binding domain. They also include a C-terminal coiled coil region, typically involved in protein-protein interactions. Despite the two orthologs having a high percentage of homology in their sequences, especially in the mentioned conserved domains, both proteins have shown an antagonistic functional behavior. Previous results in our group outlined the formation of iBRAF dimers as well as the interaction of iBRAF with BRAF35. In this work we created coiled-coil mutants of iBRAF and we studied, through a yeast two hybrid assay, the interaction between those mutants and the wild type. While the normal iBRAF homodimerized and bound BRAF35, the interactions were impaired in both coiled-coil mutants. Afterwards we performed EMSA assays with the scope of analyzing whether the coiled coil mutations modified the DNA binding properties of these proteins. Moreover, we obtained point mutations in the HMG domain of either iBRAF or BRAF35 and we checked the loss of the DNA interaction features. Finally, we assessed the consequences of the coiled coil and the HMG domain mutations on the transcriptional effects of BRAF35 and iBRAF.

P21-6

Mesenchymal gene activation by Snail1

Josep Baulida Estadella¹, Jelena Stanisavljevic¹ y Montserrat Porta de la Riva²

¹*IMIM-Hospital del Mar, Barcelona,* ²*IDIBELL, Hospitalet*

Stemness, fibroblast activation and epithelial to mesenchymal transition (EMT) are cell programs involved in tumor progression that share gene expression signatures

to a certain extension. Snail1 is a transcriptional repressor involved in the control of these cell programs; therefore, molecular mechanisms involved in gene regulation by Snail1 emerge as potential therapeutic targets. We found that the transcription factor TFPC2c, also named LSF or LBP-1c, is involved in the activation of FN1 by Snail1. In epithelial cells target to undergo EMT, we found that repression of E-cadherin by Snail1 was required for activation of mesenchymal genes. Down-regulation of E-cadherin allowed the release of b-catenin as well as the release of a previously undescribed pool of p65NF- κ B subunit anchored to the E-cadherin dependent cell-cell contacts. Released molecules translocate to the nucleus where they act as transcriptional coactivators of mesenchymal genes, like FN1 or LEF1. In addition, p65NF- κ B binding to specific promoters sites mediated the recruitment of Snail1 and chromatin modulators to the FN1 promoter. During EMT induced by TGF β , Snail1 acts first as an inhibitor of epithelial genes, but later, in tandem with the entrance of p65NF κ B to the nucleus, Snail1 binds to the FN1 promoter which is then activated. We described a cluster of genes codifying for extracellular matrix molecules that is controlled by this mechanism. The mechanism is also active during the activation of fibroblasts by stimuli that increase endogenous Snail1. Further characterization of the genes activated by Snail1 and the mechanisms underlying this activation may unveil pharmacological targets to block cell properties related with tumour progression.

P21-7

Los intrones de SUS1 son necesarios para la eficiente exportación nuclear de mRNA en levadura

Varinia García-Molinero¹, Bernardo Cuenca-Bono¹, Pau Pascual-García¹, Hernan Dopazo¹, Ana Llopis¹, Josep Vilardell² y Susana Rodríguez-Navarro¹

¹*Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia,*

²*Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Barcelona*

El acoplamiento eficiente entre la síntesis y la exportación de los RNA mensajeros es esencial para la expresión génica. Sus1/ENY2, un componente de los complejos SAGA y TREX-2, participa tanto en la transcripción como en la exportación de los mRNA. Mientras que la mayoría de los genes en levadura no contienen intrones, el gen *SUS1* posee dos. Nosotros demostramos que esta característica está conservada evolutivamente y es crítica para la función de la proteína Sus1. Además, determinamos

que aunque el *splicing* de *SUS1* es ineficiente, responde a las condiciones celulares, y mutaciones intrónicas pueden promover o bloquear el *splicing* llevando a defectos en la exportación de mRNA o en el crecimiento celular. Consistente con esto, hemos encontrado que una versión sin intrones de *SUS1* solo rescata parcialmente los fenotipos del mutante *sus1D*, e interesadamente, el *splicing* de cada intrón de *SUS1* está afectado por la presencia del otro y por secuencias exónicas. Haciendo un seguimiento de los niveles de RNA y de proteína de *SUS1* demostramos que la vía del *non-sense mediated decay* (NMD) y el factor de *splicing* Mud2 juegan un papel en la expresión de *SUS1*. De manera que nuestros datos aportan evidencias de la implicación del *splicing*, la traducción, y la degradación en la regulación de eventos tempranos en la biogénesis de mRNP, e implican un requerimiento adicional para mantener un balance en las distintas formas de *splicing* de un único gen.

P21-8

Implicaciones fisiológicas de la respuesta a la deficiencia de nutrientes promovida por las eIF2 α quinasas en *Schizosaccharomyces pombe*

Ruth Martín Martín, Juan José Berlanga Chiquero y César de Haro Castilla

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

En *Schizosaccharomyces pombe* existen tres eIF2 α quinasas responsables de regular la síntesis de proteínas en respuesta a diferentes tipos de estrés: el ortólogo de Gen2 de *Saccharomyces cerevisiae*, Hri1 y Hri2. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la activación tanto de Gen2, como de Hri2 en respuesta a estrés oxidativo, choque térmico o daño en el DNA. Utilizando cepas mutantes que expresan dos de las tres eIF2 α quinasas, una o ninguna, hemos determinado la implicación de cada una de estas proteínas en la respuesta a estrés por ausencia de nutrientes. Nuestros resultados indican que en ausencia de una fuente externa de nitrógeno en el medio de cultivo se activan tanto Hri1 como Gen2, fosforilando a su sustrato eIF2 α ; mientras que en ausencia de glucosa se activan tanto Hri1 como Hri2. Además, Hri1 es la principal eIF2 α quinasa activada cuando las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, hemos observado que Gen2, a pesar de no jugar un papel principal en la fosforilación de eIF2 α en respuesta a la privación de nutrientes, favorece el crecimiento celular en situaciones de ausencia de nitrógeno y mejora la capacidad de supervivencia de las células en condiciones de privación de glucosa.

P21-9

The proteasomal/TREX-2 subunit Sem1 is required for SAGA dependent histone H2B deubiquitination

Encar García-Oliver, Celia Martínez-Jimenez, Pau Pascual-García, Ana Llopis y Susana Rodríguez-Navarro

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia

Growing evidence indicates a link between NPC-mediated mRNA export and transcription. Sus1 (in humans, ENY2) physically couples activated genes to the NPC as part of two protein complexes; SAGA - a transcriptional coactivator with histone modifier activity- and TREX2 - a NPC associated export complex which roles in mRNA biogenesis. Here we show that the conserved proteasomal subunit Sem1 is required to coordinate the role of Sus1 in transcription coupled to mRNA export. Sus1 binds to Sem1, which absence leads to a preferential association of Sus1 to SAGA. This is of functional relevance since cells lacking SEM1 exhibit a defective activation of SAGA dependent genes. We have mechanistically addressed this phenotype by assessing that Sem1 is required for full SAGA dependent H2B deubiquitination at GAL1 promoter both in vivo and in vitro. Thus we unveil a novel Sem1 function in coordinating Sus1 mediated histone H2B deubiquitination facilitating transcription coupled to mRNA export.

P21-10

La eIF2 α quinasa GCN2 tiene efecto antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y es degradada durante la infección viral

Javier del Pino García¹, José Luis Jiménez², Iván Ventoso¹, Alfredo Castello³, M^a Ángeles Muñoz-Fernández⁴, César de Haro¹ y Juan José Berlanga¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid,

²Plataforma de Laboratorio, Hospital General

Universitario Gregorio Marañón, Madrid, ³European

Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, ⁴Laboratory of Molecular Immunobiology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

La fosforilación reversible de la subunidad alfa del factor eucariótico 2 de iniciación de la traducción (eIF2 α) es un mecanismo bien caracterizado de control de la síntesis de proteínas en respuesta a una amplia variedad de formas de estrés celular, incluyendo la infección viral. Además de

PKR, la eIF2alfa quinasa GCN2 participa en la respuesta celular frente a la infección por virus con tropismo por el sistema nervioso central. En este trabajo mostramos que la infección de células humanas (línea celular linfoide MT-2 y células mononucleares de sangre periférica, PBMC) con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) conlleva la degradación proteolítica de GCN2. Además, las proteasas de los virus HIV-1 y HIV-2 son capaces de producir de forma directa el corte proteolítico de GCN2 in vitro. Hemos podido identificar el aparentemente único sitio de corte de la proteasa de HIV-1 en una región de GCN2 situada justo delante del dominio eIF2 α quinasa, comprobando que esa rotura impide la activación in vitro de GCN2 en respuesta a la presencia del RNA de HIV-1. Por otra parte, la transfección de distintas líneas celulares con plásmidos que codifican el RNA genómico de HIV-1 resultó en la activación de GCN2 y la subsecuente fosforilación de su sustrato eIF2 α . Además, la transfección con los mismos plásmidos de células carentes de GCN2 o de células con bajos niveles de fosforilación de eIF2 α , produjo un marcado incremento de la síntesis de las proteínas de HIV-1. En resumen, nuestros hallazgos sugieren que el RNA viral producido durante la infección de HIV-1 activa GCN2 que, mediante la fosforilación de eIF2 α , provocaría la inhibición de su traducción, y que el virus contrarrestaría este efecto antiviral produciendo el corte proteolítico de GCN2.

P21-11

Análisis estructural del dominio de expresión del locus de la tirosinasa de ratón a través de 3C

Daive Seruggia, Marta Cantero y Lluís Montoliu
 Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

La tirosinasa es el enzima principal en la síntesis de melanina. Entre otras funciones en la ruta lleva a cabo la doble oxidación de L-tirosina a Dopaquinona, a través de L-DOPA. El gen se expresa específicamente en melanocitos derivados de la cresta neural y en las células del epitelio pigmentado de la retina, derivadas de la copa óptica. El gen de la tirosinasa (*Tyr*) reside en el cromosoma 7 de ratón, y es sinténico con el locus ortólogo del genoma humano, en el cromosoma 11. En ambos genomas el locus de la tirosinasa ocupa alrededor de 100 kb, y está ubicado entre los genes *Nox4* y *Grm5*, con patrones de expresión distintos. Mediante estudios con ratones transgénicos con diversas construcciones del gen de la tirosinasa, acotamos el dominio de expresión del locus e identificamos los elementos reguladores principales, incluida una región controladora del locus, o LCR, y la presencia de elementos aisladores. Mediante genómica comparativa otros autores

han propuesto la existencia de elementos reguladores adicionales, cuya relevancia está todavía por demostrar. Con objeto de estudiar las interacciones entre los distintos elementos reguladores descritos y el promotor del locus de la tirosinasa de ratón, hemos iniciado una serie de experimentos con la tecnología de “*Chromosome Conformation Capture*” (3C) que permite visualizar los contactos *in vivo* de distintas regiones del genoma. En este trabajo presentamos los primeros resultados obtenidos en células de melanoma de ratón (B16), que expresan el gen de la tirosinasa, y fibroblastos L929, que no transcriben el gen. Los resultados obtenidos mediante 3C nos permiten proponer un modelo estructural de organización del locus de la tirosinasa en el genoma de ratón.

P21-12

Regulación del gen *KIHEM13* por parte de *KlIx1p* en *Kluyveromyces lactis*

Agustín Rico Díaz, Ángel Vizoso Vázquez y María Esperanza Cerdán Villanueva
 Grupo EXPRELA. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad da Coruña, A Coruña

El gen *KIHEM13* de *Kluyveromyces lactis* es un gen hipóxico que codifica el enzima coproporfirinógeno oxidasa (CPO), que participa en la síntesis del grupo Hemo. En trabajos anteriores se ha visto como el gen homólogo de *Saccharomyces cerevisiae* (*HEM13*) es regulado de forma positiva por *Ixr1p*, un factor de transcripción caracterizado por la presencia de dominios HMG. *K. lactis* posee un gen putativo (*KlIXR1*) que guarda cierta homología con *IXR1* de *S. cerevisiae*, especialmente en las regiones con dominios HMG. A fin de caracterizar un posible papel regulador de *KlIx1p* sobre el gen *KIHEM13* en la respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, se ha anulado el gen *KlIXR1* para analizar la actividad del promotor del gen *KIHEM13* en las cepas silvestre y su variante con el gen *IXR1* delecionado. Para ello se ha utilizado una construcción reportera con el promotor de *KIHEM13* fusionado al gen *lacZ*. El gen *KlIXR1* se ha clonado también en el vector *YepLac195* y se han realizado ensayos de complementación en *S. cerevisiae*.

P21-13

Predicción bioinformática y validación experimental de nuevos aisladores genómicos

Cristina Vicente-García¹, Eduardo Moltó², Juan J. Tena³, Ana Fernández-Miñán³, Natalia Jiménez¹, Laura Barrios⁴, Alberto Pascual-Montano¹, José María Carazo¹, José Luis Gómez-Skarmeta³ y Lluís Montoliu¹

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, ²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, ³Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, ⁴Unidad de Estadística, CSIC, Madrid

Los genomas de vertebrados están organizados funcional y estructuralmente en dominios, que incluyen todos los elementos reguladores necesarios para la correcta expresión de los genes que contienen. Estos dominios están delimitados por aisladores genómicos, elementos reguladores con propiedades de bloqueo de enhancers y de barrera, y que contribuyen a la organización estructural del locus mediante la interacción con la arquitectura nuclear. Se han descrito multitud de secuencias de unión a CTCF, un factor nuclear asociado a aisladores genómicos en vertebrados, utilizando métodos de análisis masivo. Sin embargo, nuestras publicaciones recientes demuestran que existen secuencias aisladoras que no requieren CTCF (por ejemplo, SINE). Por ello hemos desarrollado nuevos algoritmos bioinformáticos, para el análisis sistemático del genoma humano y de ratón, utilizando herramientas como aGEM, que permiten inspeccionar el patrón de expresión de genes en diversos tejidos y compararlos frente al de sus vecinos inmediatos, centrándonos en aquellos que presenten diferencias y explorando las secuencias intergénicas correspondientes, en particular aquellas que hayan sido conservadas evolutivamente. Para validar funcionalmente estos aisladores genómicos aplicamos el método diseñado en el laboratorio. Primero, realizamos un test in vitro de bloqueo de enhancer en células de mamífero en cultivo. En segundo lugar, evaluamos estos mismos elementos in vivo, usando construcciones similares en pez cebra. Los aisladores descritos con este método pueden funcionar en construcciones heterólogas, como transgenes y vectores de terapia génica, combatiendo eficazmente los efectos de posición cromosomales.

P21-14

La presencia de aisladores genómicos contribuye a la selectividad de las dianas del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF)

María Tiana¹, Diego Villar¹, Eva Perez-Guijarro¹, Laura Gómez-Maldonado¹, Eduardo Moltó², Ana Fernández-Miñán³, José Luis Gómez-Skarmeta³, Lluís Montoliu⁴ y Luis del Peso¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, ²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, ³Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, ⁴Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) juega un papel fundamental en la respuesta transcripcional a hipoxia, y por tanto en la adaptación a bajas concentraciones de oxígeno. En el presente trabajo hemos tratado de profundizar en las bases de la selectividad de los genes dianas de HIF, utilizando como paradigma la respuesta transcripcional a hipoxia de una pareja de genes: *GYS1* y *RUVBL2*, de transcripción opuesta pero con sus inicios de transcripción a menos de 1kb. A pesar de que el elemento de respuesta a hipoxia (HRE) se localiza entre ambos genes, únicamente los niveles de mRNA de *GYS1* incrementan en respuesta a hipoxia, mientras que los niveles de mRNA de *RUVBL2* permanecen constantes. Sin embargo, la falta de inducción de *RUVBL2* no se debe a su silenciamiento, dado que en un amplio panel de líneas celulares los niveles de mRNA en condiciones de normoxia son similares o incluso mayores que los de *GYS1*, al igual que la actividad promotora de las construcciones indicadoras en normoxia. Utilizando diferentes construcciones derivadas de este locus, hemos determinado que la región localizada entre el HRE y el promotor de *RUVBL2* previene la inducción de este gen en condiciones de bajo oxígeno, ya que su eliminación permite la inducción de su actividad promotora en respuesta a la activación de HIF. Ensayos de bloqueo de enhancer in vitro también parecen indicar la existencia de un aislador genómico en esta región. Además, el promotor de *RUVBL2* presenta actividad aisladora en ensayos de bloqueo de enhancer desarrollados in vivo en Zebrafish. En este trabajo se describe por primera vez un aislador genómico que actúa frente a un estímulo ambiental como es la hipoxia y explica cómo se consigue la selectividad de HIF sobre sus dianas.

P21-15

Klhem13p* y moonlighting en *Kluyveromyces lactis

Ángel Vizoso, Isabel González-Siso, Manuel Becerra, Esther Rodríguez-Belmonte y M. Esperanza Cerdán

Grupo EXPRELA. Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de la Coruña, A Coruña

HEM13 es un gen hipóxico que codifica para el enzima coproporfirinógeno III oxidasa (CPO) implicado en la síntesis del grupo hemo en levaduras. Se ha resuelto la estructura de CPO de *S. cerevisiae* y se ha visto que su forma funcional enzimática es un dímero (Phillips et al., 2004). En trabajos previos de nuestro laboratorio, trabajando con el gen *KIHEM13* de *Kluyveromyces lactis*, hemos detectado la presencia de dos ATG que actúan como dos TIC alternativos, dando lugar a dos proteínas de distinto tamaño. Además, hemos comprobado que *KIHEM13* tiene un efecto regulador sobre la región promotora de su gen. Existen ejemplos de proteínas moonlight en *Saccharomyces cerevisiae* (Ruiz et al., 2009), en donde una misma proteína muestra multifuncionalidad, pero hasta la fecha no se han descrito casos en *Kluyveromyces lactis*.

En el presente trabajo se han realizado ensayos de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*), Western blot y complementación con el objetivo de demostrar la multifuncionalidad de *KICPO* y su relación con la presencia de TIC alternativos.

P21-16

Caracterización de la proteína ReCQL5 humana en *Saccharomyces cerevisiae*

Juan Fco. Lafuente Barquero y Andrés Aguilera López

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Sevilla

La estabilidad del genoma no solo está comprometida por la posible acción de agentes externos, sino que los propios procesos celulares como la transcripción o la replicación tienen un gran impacto. Estos favorecen la generación de roturas de doble cadena (DSB) en el DNA que pueden dar lugar a la aparición de mutaciones, aumento de la inestabilidad cromosómica o muerte celular. Para minimizar el efecto de estos daños, las células deben regular finamente todos los procesos implicados en el metabolismo del material genético.

La familia RecQ de helicasas de DNA es una de las más conservadas en la evolución. Sin embargo, se han descrito hasta cinco miembros presentes en mamíferos mientras que

organismos más sencillos sólo presentan una, lo que sugiere que se han ido diversificando y especializando con el tiempo. Se la considera una familia de proteínas importante en el mantenimiento de la integridad del genoma, ya que defectos en tres de las hRecQ están asociados a los síndromes genéticos de Werner (WRN), Bloom (BLM) y Rothmund-Thompson (RECQL4) que manifiestan un incremento en la inestabilidad genética.

Aunque RECQL5 no está vinculada actualmente a ninguna enfermedad, presenta unas características únicas dentro de la familia, como su expresión ubicua e independiente del ciclo celular y sobre todo su interacción directa con la RNA polimerasa II, lo que la relaciona con el proceso de la transcripción y su regulación. El objetivo de nuestro trabajo se basa en caracterizar la RECQL5 humana y aprender sobre su papel en la interfaz transcripción/replicación. Para ello, hemos empleado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo, dado su potencial a la hora de realizar estudios tanto genéticos como moleculares.

P21r-17

Cdh1 es necesaria para mantener la eficiencia de orígenes y evitar los reordenamientos cromosómicos mediante la regulación de la actividad CDK en *S. cerevisiae*

Fernando Devesa, Pilar Ayuda-Durán y Arturo Calzada

Centro Nacional De Biotecnología (CSIC), Madrid

La correcta progresión de las células eucariotas por el ciclo celular es necesaria para mantener la estabilidad genómica. Para ello se requiere una adecuada regulación de la actividad CDK-ciclina. Cdh1 es un activador del complejo APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) desde final de mitosis hasta G1 que estimula el reconocimiento y ubiquitinación de muchos sustratos específicos, como por ejemplo las ciclinas mitóticas. Tanto la disminución de los niveles de Cdh1 como un aumento de sus sustratos es frecuente en células cancerosas. El aumento de actividad CDK produce mayor inestabilidad genómica posiblemente ligada a la menor eficiencia de los orígenes de replicación. Se ha sugerido que Cdh1 sea importante para prevenir reordenamientos cromosómicos regulando CDK, pero se desconoce. En respuesta a esa pregunta nuestro trabajo en células delecionadas para Cdh1 muestra un aumento de la tasa de reordenamientos. Además hay ineficiencia de algunos orígenes en disparar horquillas (en diferente extensión) mientras que la mayoría son resistentes. Asimismo, observamos que el origen más cercano a la zona donde medimos la tasa de reordenamientos pierde eficiencia en células sin Cdh1. Significativamente, la

adición de una copia adicional del gen que codifica para Sic1 (un inhibidor específico de complejos CDK-ciclinas Clb1-6 en G1) es capaz de revertir ambos defectos, demostrando que su principal causa es la desregulación de la actividad CDK durante la fase G1 del ciclo.

En conclusión, Cdh1 previene la inestabilidad genómica en forma de reordenamientos cromosómicos principalmente regulando la actividad CDK en G1. Cdh1 también promueve el disparo eficiente de horquillas de replicación en el inicio de fase S. Si estos procesos tienen relación de causa-efecto está en investigación.

P21-18

Papel de XTP3TPA en el mantenimiento de la homeostasis de nucleótidos y la integridad del genoma

C. Requena-Torres, A.E. Vidal, L.M. Ruiz-Pérez y D. González-Pacanowska
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC, Armilla (Granada)

XTP3-transactivated protein A (XTP3TPA) pertenece a la familia de las todo- α NTP pirofosfatasa, cuya función celular consiste en la hidrólisis de nucleósidos trifosfato no canónicos como el 8-oxo-dGTP o dUTP, evitando así su incorporación al DNA y manteniendo la integridad del genoma. Con el fin de esclarecer el papel biológico de XTP3TPA hemos caracterizado su actividad enzimática y determinado su especificidad de sustrato como nucleótido hidrolasa. In vitro, XTP3TPA hidroliza preferentemente desoxinucleósidos trifosfato de citosina, tanto dCTP como formas no canónicas modificadas en 5' como el 5-Me-dCTP, 5-I-dCTP o 5-Br-dCTP. Además, cataliza eficientemente la hidrólisis del agente hipometilante 5-aza-dCTP (decitabina) lo que sugiere que podría actuar contrarrestando la actividad antitumoral de este fármaco in vivo. XTP3TPA se localiza en el citosol, mitocondria y núcleo de células MRC-5 y TK6, y su expresión es dependiente de la fase del ciclo celular alcanzándose un mayor nivel de proteína en G2/M. La depleción de XTP3TPA mediante RNAi no tiene un impacto significativo sobre la proliferación celular pero provoca un desbalance en el pool de nucleótidos, aumentando sensiblemente la concentración intracelular de dCTP. Todos estos resultados sugieren que XTP3TPA podría ejercer una doble función celular, actuando tanto en el mantenimiento de un pool intracelular apropiado de nucleótidos como en la detoxificación de ciertos nucleótidos modificados, principalmente el 5-Me-dCTP.

P21-19

La ausencia de las proteínas TIA altera el patrón transcriptómico y el fenotipo de los fibroblastos embrionarios de ratón

Carmen Sánchez Jiménez, Isabel Martínez Carrasco y José M. Izquierdo
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Ratones modificados genéticamente para no expresar las proteínas TIA1 (*T-cell intracellular antigen 1*) o TIAR/TIAL1 (*TIA1 related/like protein*) se caracterizan por presentar altas tasas de letalidad embrionaria, sugiriendo un importante papel para estas proteínas durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, las repercusiones moleculares y celulares ligadas a esta falta de función no han sido caracterizadas y son, por tanto, pobremente entendidas.

Nuestro grupo de investigación, mediante una aproximación experimental de alto rendimiento, ha abordado la caracterización del transcriptoma asociado a la inactivación de la expresión de las proteínas TIA en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Los resultados demuestran la alteración del transcriptoma característico del programa de desarrollo embrionario normal del ratón así como del acoplamiento entre los eventos moleculares que deberían concurrir en una situación de homeostasis celular. En consonancia con estos resultados, los MEF sin expresión de TIA1 o TIAR muestran tasas de proliferación celular disminuidas, anomalías en el desarrollo y en la resolución del ciclo celular y deficiencias metabólicas que van acompañadas de altas tasas de muerte celular.

El conjunto de nuestros resultados aporta nuevas evidencias para entender mejor los cambios moleculares y celulares asociados a la función de las proteínas TIA durante el desarrollo embrionario, confirmando un papel clave para estos reguladores en la orquestación y en la ordenación temporal del transcriptoma durante el desarrollo embrionario temprano del ratón.

Nota: Proyecto BFU2008-00354/BMC financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER.

P21e-20

SHP-1 regula la expresión génica mediante cambios en la metilación del DNA en cáncer de próstata

Ana González Corpas, Nadia Ashour Fernández, Raúl Alelú Paz, Ariel Ernesto Cariaga Martínez, Pilar López-Ruiz, Begoña Colás Escudero y Santiago Roper Salinas

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares*

SHP-1 es una fosfotirosina fosfatasa (PTP) que se expresa preferentemente en células hematopoyéticas aunque también se ha descrito su presencia en tejidos sólidos como la próstata. Nuestro grupo ha demostrado que esta proteína está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo y que juega un papel muy importante en el control del ciclo celular de células tumorales de próstata. En este trabajo nos planteamos la posibilidad de que SHP-1 pudiese ejercer parte de estos efectos regulando la expresión génica a través de cambios en las modificaciones epigenéticas. Para ello hemos comparado el estado de metilación de 1505 CpG, presentes en la región promotora de 807 genes en las líneas celulares PC3 y LNCaP en las que se anuló la expresión de SHP-1 mediante siRNA. Nuestros datos indican que la falta de SHP-1 disminuye el estado de metilación de 18 sondas en células LNCaP, que expresan elevados niveles de SHP-1, mientras que no produce cambios relevantes en células PC3 que expresan niveles mas bajos de esta proteína. En 5 de los 18 genes seleccionados (*GSTP-1*, *RUNX1T1*, *NPY*, *HIN-1* y *KIT*), la pérdida de metilación observada se correlacionó con un aumento en la cantidad de RNA mensajero. Además, el tratamiento de las células LNCaP con 5-Aza-2-deoxicitidina produjo un aumento en la expresión de los 5 genes seleccionados de modo similar al producido por la pérdida de expresión de SHP1, mientras que no modificó la expresión de genes cuyos niveles no variaron con la disminución de SHP-1. En conclusión, nuestros datos sugieren que en líneas celulares de cáncer de próstata SHP-1 podría regular la expresión de genes con importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular mediante un mecanismo que, al menos en parte, implica cambios en las modificaciones epigenéticas.

P21-21

Influence of chromatin at the integration site on the establishment of HIV latency. A role for co-transcriptional chromatin reassembly factors

Albert Jordan y Edurne Gallastegui
*Instituto de Biología Molecular de Barcelona,
Barcelona*

The presence of a reservoir of HIV latently infected resting T cells in patients successfully treated with HAART, prevents the total eradication of the virus and converts its infection in a chronic disease. To achieve its eradication, it would be needed to combine HAART with drugs able to reactivate the dormant viruses. Our objective is to understand how is latency established after infection and

proviral integration into the genome, with the aim of identifying factors involved that could be targeted by new therapeutic approaches. We have previously described a new cellular model for HIV latency after infection of Jurkat cells with an HIV minigenome expressing GFP as a reporter, and reported that the site of integration (and its chromatin structure) determines basal transcriptional activity of the promoter. We and others have found latent virus integrated into centromeric alphoid repeats (heterochromatin), gene deserts and introns of active genes. In such case, transcriptional interference has been proposed as the reason for HIV repression. We have found that co-transcriptional chromatin reassembly factors (such as SPT6 and CHD1) travelling with the RNA polymerase along the host gene maintain a repressive chromatin environment that enables HIV promoter activation. Depletion of these factors promotes HIV reactivation, concomitant with chromatin relaxation and decrease of general RNA polimerase activity. In parallel, our HIV latency cellular model has been useful to identify new drugs capable of reactivating latent HIV.

P21-22

Las proteínas TIA como supresores de la proliferación celular

Isabel Martínez Carrascoso, Carmen Sánchez Jiménez y José M. Izquierdo
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM, Madrid

Las proteínas TIA1 (*T-cell intracellular antigen 1*) y TIAR/TIAL1 (*TIAR-related/like protein*) son dos proteínas de unión a DNA/RNA que controlan diferentes aspectos del metabolismo del RNA. Estas proteínas son similares estructuralmente a las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP), presentando tres motivos de reconocimiento de RNA y un dominio carboxilo terminal rico en glutamina. Al igual que las hnRNP pueden localizarse tanto en el núcleo, regulando la transcripción o el procesamiento alternativo de los pre-RNA, como en el citoplasma, actuando como reguladores de la estabilidad y/o de la traducción de los RNA mensajeros.

Resultados recientes de nuestro grupo han demostrado que la reducción de la expresión de las proteínas TIA en células HeLa promueve un incremento de la proliferación celular, una alta capacidad de crecimiento dependiente e independiente de anclaje así como una mayor migración e invasión. La inyección de estas células en ratones inmunodeprimidos, frente a las células control correspondientes, aceleran el desarrollo de tumores de origen epitelial altamente desdiferenciados, proliferativos y angiogénicos. Además, hemos identificado tumores humanos de origen epitelial que presentan un patrón de expresión reducido de estas proteínas.

En esta comunicación presentaremos los resultados más recientes en relación a la caracterización de los perfiles transcriptómicos y proteómicos asociados a las células con expresión reducida de las proteínas TIA con el fin de identificar los mecanismos preferentes que operan y que explican el comportamiento fenotípico más tumorigénico ligado a la falta de función de las mismas.

Nota: Proyecto BFU2008-00354/BMC financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER.

P21-23

Regulación del operón *hpxFGHIJK* implicado en la conversión de alantoato a ureidoglicina y caracterización de *hpxK* de *Klebsiella pneumoniae*

Karla Guzmán López, Eva Campos Ceprian, Juan Aguilar Piera, Laura Baldomà Llavines y Josefa Badía Palacín

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona

La utilización de alantoato como fuente de nitrógeno puede seguir vías alternativas dependiendo del organismo. En *K. pneumoniae* el sistema génico implicado en la degradación de alantoato a ureidoglicina consta de dos unidades transcripcionales *hpxFGHIJK* y *hpxU*. El gen *hpxU* codifica un regulador de la familia RpiR, *hpxK* una alantoato amidohidrolasa, *hpxJ* una ureidoglicina aminotransferasa y *hpxFGHI* podrían codificar proteínas transportadoras tipo ABC implicadas en el transporte de alantoato al interior celular. El análisis de fusiones transcripcionales indica que la presencia de alantoato o alantoato en el medio induce la expresión del operón *hpxFGHIJK*, mientras que la expresión de *hpxU* es constitutiva. Ensayos de retardación de la movilidad electroforética en gel, utilizando HpxU y como sonda la región promotora de *hpxF*, realizados en presencia y ausencia de diferentes moléculas efectoras, han mostrado que HpxU se une a la región promotora de *hpxF* y que el alantoato es la molécula efectora capaz de disociar el complejo de retardación. Estos resultados muestran que HpxU actúa como represor de la transcripción del operón *hpxFGHIJK*. Ensayos efectuados con diferentes sondas de la región promotora de *hpxF* confirman la unión de HpxU a una secuencia palindrómica situada entre las posiciones +30 y +67 respecto al inicio de transcripción de *hpxF*. Se ha asignado función a proteínas codificadas en este sistema génico, previa expresión de las mismas a partir de los genes clonados en el vector pMal que permite

la purificación de proteínas por afinidad a columnas de amilosa. Concretamente se ha asignado función como alantoato amidohidrolasa a HpxK y se han determinado los parámetros cinéticos $K_m=0,11\text{mM}$ y $V_{max}=4 \times 10^{-2}\text{UI/mg}$.

P21-24

El factor de transcripción C/EBP β regula la expresión de NOS2 en células microgliales activadas

Marco Straccia¹, Nuria Gresa-Arribas², Guido Dentesano², Aroa Ejarque-Ortiz², Josep M Tusell², Joan Serratos², Carme Solà² y Josep Saura¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC, IDIBAPS); *Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona,* ²Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC, IDIBAPS), *Barcelona*

C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta) es un factor de transcripción de la familia b-zip cuya expresión aumenta en células microgliales activadas. Nuestro objetivo en este trabajo ha sido estudiar si C/EBP β regula en la activación microglial la expresión de NOS2, un enzima inducible productor de NO y que se cree es clave en los efectos patogénicos de la respuesta neuroinflamatoria. El gen de NOS2 presenta secuencias consenso para C/EBP en sus regiones reguladoras. El trabajo se ha realizado en cultivos de glía mixta de corteza cerebral de embriones (E19) de ratones *wild-type* y deficientes en C/EBP β . Estos cultivos constan principalmente de astrocitos y microglía y han sido tratados con LPS o LPS+IFN γ para inducir su activación. Hemos observado que en la activación glial se induce la expresión de NOS2 (qRT-PCR), que se localiza en microglía y no en astrocitos (inmunoquímica) y que en estas condiciones C/EBP β se une al promotor de NOS2 (qChIP). Por otro lado, en cultivos gliales deficientes en C/EBP β tratados con LPS o LPS+IFN γ se produce una marcada atenuación en la inducción de NOS2 a nivel de mRNA (qRT-PCR), proteína (WB e icc) y producción de NO (Griess). Finalmente, al cocultivar neuronas con microglía *wild-type* o deficiente en C/EBP β hemos observado que la neurotoxicidad inducida por células gliales activadas se ve totalmente abolida cuando la microglía es deficiente en C/EBP β . Este trabajo demuestra que C/EBP β regula la expresión de NOS2 en células microgliales activadas y apunta a C/EBP β como un importante regulador de la expresión de genes con efectos neurotóxicos en la respuesta neuroinflamatoria.

Nota: Financiado por ISCIII PI08/1396 y PI10/378.

P21-25

Acciones antiinflamatorias de las prostaglandinas ciclopentenonas sobre la expresión génica en linfocitos T

Raquel Nieto Pintado y Miguel Ángel Íñiguez Peña
Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid

Los efectos antiinflamatorios de las ciclopentenonas PGA_1 y $15d-D^{12,14}$ - PGJ_2 tienen lugar principalmente mediante la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios, como consecuencia de la interferencia de estas prostaglandinas con la activación de factores de transcripción como $NF\kappa B$ y AP-1. Se han descrito dos mecanismos esenciales en la acción de las ciclopentenonas, ya sea a través de la vía del receptor $PPAR\gamma$, o mediante reacciones de prostanoilación. En este trabajo hemos analizado los efectos de la $15d$ - PGJ_2 y PGA_1 sobre la expresión génica en la línea celular Jurkat. Se ha estudiado el efecto de estas ciclopentenonas sobre la expresión de un panel de 384 genes por RT-PCR cuantitativa, tras la activación celular con TPA + Ionóforo de calcio, encontrando un grupo de genes con una expresión disminuida tras el tratamiento con estas, entre los que se encuentran genes pro-inflamatorios como el $TNF\alpha$, la $COX-2$, la $IL-6$ y la $IL-2$. El estudio del efecto de PGA_1 y $15d$ - PGJ_2 sobre la regulación transcripcional de estos genes, en comparación con los efectos de moléculas relacionadas, como el $CAY10410$, la 2-ciclopenten-1-ona, o ligandos del $PPAR\gamma$, nos ha permitido determinar la importancia del anillo ciclopentenona y la independencia del receptor $PPAR\gamma$. El análisis de las acciones de las ciclopentenonas sobre factores de transcripción ha puesto de manifiesto el efecto inhibitorio sobre la activación, no sólo de $NF\kappa B$ sino también de $NFAT$ y sobre la regulación de la transcripción génica mediada por este último. Estos resultados permiten aportar nuevos datos sobre los mecanismos de los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores de las prostaglandinas ciclopentenonas y contribuyen al entendimiento de sus potenciales aplicaciones farmacológicas.

P21r-26

Análisis del estado epigenético de un transgén en células ovinas utilizadas en transferencia nuclear

Israel Salcedo González, Virginia Nieto Romero, Sara García Alonso, Sandra Fuertes Álvarez, Silvia Nicolás Alonso y Margarita Marqués Martínez

Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal - Universidad de León, León

Cuando se introduce un transgén en el genoma de células animales, su expresión se ve condicionada por la estructura de la cromatina, así como por los patrones de metilación en el DNA y por las modificaciones de las histonas en la zona de integración. Estos parámetros pueden alterar el patrón de expresión esperado, provocando los denominados efectos de posición. Los aisladores genómicos son capaces de proteger a los genes que flanquean de señales reguladoras inapropiadas de su entorno genómico, colaborando así en el mantenimiento de dominios de expresión y desempeñando un papel relevante en la regulación génica. Nuestro grupo de investigación está evaluando el grado de protección frente a los efectos de posición que ejercen el aislador 5'HS4 del *locus* de la $[\beta]$ -globina del pollo y el aislador del gen de la tirosinasa murina, en células ovinas destinadas a transgénesis y transferencia nuclear (fibroblastos fetales ovinos SBFF). Los experimentos se han realizado en paralelo en la línea celular murina C2C12. Se han generado clones celulares estables en los que cada uno de estos aisladores flanquea un *cassette* de expresión (promotor del gen murino de la fosfoglicerato kinasa -PGK- dirigiendo la expresión del gen de la proteína verde fluorescente -GFP-). El análisis de conjuntos de clones mediante citometría de flujo ha puesto de manifiesto que, en presencia de ambos aisladores, se produce un incremento altamente significativo del porcentaje de células que expresan el transgén ($p < 0,001$), así como de los niveles de expresión del mismo (intensidad de fluorescencia). Para complementar estos estudios, en este trabajo se investiga el estado epigenético del *cassette* PGK-GFP mediante análisis de metilación de islas CpG con secuenciación de DNA modificado con bisulfito.

P21r-27

Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmotic stress

Mariona Nadal-Ribelles¹, Carme Sole Serra¹, Claudine Kraft², Matthias Peter², Francesc Posas Garriga¹ y Eulàlia de Nadal Clanchet¹

¹Cell Signalling Unit, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, ²Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH), Institute of Biochemistry, Zurich (Switzerland)

Protein ubiquitylation is a key process in the regulation of many cellular processes. The balance between the activity of ubiquitin ligases and that of proteases controls the level

of ubiquitylation. In response to extracellular stimuli, stress-activated protein kinases (SAPK) modulate gene expression to maximize cell survival. In yeast, the Hog1 SAPK plays a key role in reprogramming the gene expression pattern required for cell survival upon osmotic stress. Here, we show that the Ubp3 ubiquitin protease is a target for the Hog1 SAPK to modulate gene expression. *ubp3* mutant cells are defective in expression of osmoresponsive genes. Hog1 interacts with and phosphorylates Ubp3 at serine 695, which is essential to determine the extent of transcriptional activation in response to osmotic stress. Furthermore, Ubp3 is recruited to osmoresponsive genes to modulate transcriptional initiation as well as elongation. Therefore, Ubp3 activity responds to external stimuli and is required for transcriptional activation upon osmotic stress.

P21-28

Nuevas isoformas de MEF2D generadas por splicing alternativo: importancia en la regulación transcripcional en músculo esquelético

María Dolores Girón González, José Dámaso Vilchez Rienda, José Garrido Mesa, Arturo Morales Portillo y Rafael Salto González

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 2, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada

MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) es una familia de reguladores transcripcionales que reconocen secuencias en promotores que codifican para proteínas específicas de músculo esquelético o que participan en la diferenciación del tejido muscular. Hay cuatro variantes (MEF2A-D) en esta familia que difieren en su distribución tisular y en sus efectos. Hemos identificado nuevas isoformas generadas por splicing alternativo a partir de mRNA de músculo esquelético de rata y de miotúbulos de rata en cultivo (células L6). En el caso de MEF2D, hemos identificado la expresión en rata de 4 isoformas, dos isoformas completas (MEF2D) conteniendo bien el exón 4A o el exón alternativo 4B y dos isoformas nuevas, una carente de los exones 5-8 (MEF2D 5-8) y que presenta el exón 4A y una última sin los exones 4-8 (MEF2D 4-8). Las cuatro se han clonado y expresado individualmente o como proteínas de fusión con GFP. Estas isoformas se han transfectado en células CHO-k1 y se ha estudiado su capacidad de regular un promotor dependiente de MEF2D. Las isoformas MEF2D y MEF2D 5-8 tienen una actividad transcripcional similar, mientras que la isoforma MEF2D 4-8 no es capaz de estimular la transcripción. Más interesante, la determinación de la

actividad transcripcional en presencia de reguladores de MEF2D, indica que mientras que la isoforma completa MEF2D es regulada por estos efectores, la isoforma MEF2D 5-8 mantiene una actividad transcripcional basal independiente de la presencia o no de efectores. Asimismo, se ha medido su expresión como proteínas de fusión con la GFP en células CHO-k1, observándose que MEF2D y MEF2D 5-8 se localizan en el núcleo de manera uniforme mientras que MEF2D 4-8 se localiza en el núcleo en forma de gránulos.

Nota: Investigación subvencionada por la Fundación Botín.

P21-29

Specificity of human histone H1 subtypes: phenotypic effects of H1 knock-down, genomic distribution and post-translational modifications

Lluís Millán-Ariño, Jean-Michel Terme, Regina Mayor, Isaura Font, Neus Luque y Albert Jordan
Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB)-CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona

At least six histone H1 variants exist in mammalian somatic cells that bind to linker DNA contributing to higher order chromatin compaction. In addition, H1 seems to be involved in the active regulation of gene expression. It is not well known whether the different variants have specific roles or regulate specific promoters. We have explored this by inducible shRNA-mediated knock-down of each of the H1 variants in a human breast cancer cell line. Rapid inhibition of each H1 variant was not compensated by changes of expression of other variants. Thus, specific phenotypes are observed in breast cancer cells depleted of individual histone H1 variants. By taking advantage of specific antibodies for H1 variants and HA-tagged recombinant H1 variants-expressing cell lines, we are currently studying the specific distribution in chromatin and in the genome of the different H1 variants and the role of H1 post-translational modifications.

P21-30

Histone H1 variants content during differentiation of human embryonic stem cells and reprogramming of keratinocytes

Jean-Michel Terme¹, Borja Sesé², Lluís Millán¹, Regina Mayor¹, Juan Carlos Izpisua Belmonte², María José Barrero² y Ibert Jordan¹

¹*Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), Barcelona*, ²*Center for Regenerative Medicine in Barcelona, Barcelona*

Seven linker histone H1 variants exist in human somatic cells (H1.0, H1.1 to H1.5, and H1X), with distinct prevalence depending on the cell type analyzed and along differentiation, which speaks up for distinct roles for the different variants. We have revisited this notion by taking advantage of recently developed methodologies to study pluripotent cells (PCs) and differentiation, (1) the induced differentiation of established human embryonic stem (hES) cell lines, and (2) the reprogramming of human keratinocytes to induced pluripotent stem (iPS) cells. hES and iPS cells present decreased levels of H1.0 and increased levels of H1.1, H1.3 and H1.5 compared to differentiated cells, as measured by gene expression and protein accumulation. PCs present a more diverse repertoire of histone H1 variants, while in terminally differentiated cells H1.0 expression stands for ca. 80% of the H1 transcripts. Analysis of histone H3 post-translational modifications at the genes for the different H1 variants has shown that while most variants present the active mark K4me2 but not the repressive mark K27me3, the H1.0 promoter contains the two of them in PCs. This bivalent domain would maintain poised the H1.0 promoter in stem cells. K27 demethylation may allow rapid H1.0 expression upon differentiation. Upon reprogramming, the bivalent domain is being rebuilt. Moreover, pluripotency transcription factors have been found sitting at the promoters of H1 variants expressed in stem cells, i.e. H1.5 and H1.3. Thus, histone H1 variants expression is controlled by a variety of mechanisms that cause distinct but consistent H1 repertoires in pluripotent and differentiated cells.

P21r-31

A comprehensive view of nascent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*

Antonio Jordán-Pla¹, Vicent Pelechano² y José Enrique Pérez-Ortín¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València, Spain, Burjassot-Valencia.* ²*European Molecular Biology Laboratory. Genome Biology. Steinmetz Group, Heidelberg-Germany*

Of special interest in the field of eukaryote functional genomics is the study of the precise behaviour of the enzymatic machinery responsible for transcription and how it is capable of modulating gene expression under different conditions. Some years ago we developed a method to label

nascent RNA in yeast, genomic run-on (GRO) [1]. Now we have found a way to widen its scope and enhance its resolution with a new labeling approach using biotin-UTP as a precursor (BioGRO). This method is suitable for high throughput transcriptome analysis, either by hybridization (tiling microarrays) or by high throughput sequencing. It is able to track every nascent transcript readily as it is generated in a cell at any given time, in both strands, and regardless of its transient/stable nature. It can provide new insights into the roles and features of cryptic sense or antisense transcription or about the mechanism of transcription elongation. Overall, our results reveal comprehensive information about the location, density and orientation of all three actively transcribing RNA polymerases along the DNA, opening the possibility for a better characterization and modeling of the regulatory steps in RNA synthesis and decay, genome-wide, with an unprecedented level of detail and precision.

[1] García-Martínez J., Aranda A., Pérez-Ortín J.E.: "Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms". *Molecular Cell* 2004; 15: 303-13.

P21r-32

Relevancia de la pérdida de expresión de GSTM2 y PENK por metilación en cáncer de próstata

Nadia Ashour Fernández¹, Ana González Corpas¹, Raúl Alelú Paz¹, Javier Angulo Cuesta² y Santiago Ropero Salinas¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Madrid,* ²*Servicio de Urología, Hospital Universitario de Getafe, Fundación para la Investigación Biomédica, Universidad Europea de Madrid, Madrid*

La búsqueda de genes que pierden su expresión por metilación en cáncer nos ayuda a conocer más en profundidad la etiología de esta enfermedad a la vez que nos proporciona nuevos biomarcadores para su detección. En este trabajo nos propusimos identificar nuevos genes metilados en cáncer de próstata, para lo que comparamos el perfil de metilación de 10 tejidos de próstata normal, 83 tumores y las líneas celulares de cáncer de próstata PC3, LNCaP y DU145 mediante los *arrays* de metilación de Illumina. Con esta herramienta hemos encontrado un grupo de genes significativamente metilados en más del 20% de los tumores analizados, de los que seleccionamos dos cuya metilación no ha sido descrita en cáncer de próstata, la proencefalina (PENK) y la glutatión S-transferasa GSTM2, cuya pérdida de función podrían tener un papel relevante en

el desarrollo de esta patología. La metilación del promotor de ambos genes se correlacionó con su pérdida de expresión en las líneas celulares de cáncer de próstata en las que se encuentran metilados, mientras que el tratamiento con 5'-aza-2'-deoxicitidina provocó su reexpresión. Nuestros datos indican que GSTM2 y PENK están metilados en el 85,5% y 42% de los tumores analizados respectivamente, que no lo están en tejidos normales, y que la metilación se correlaciona con la pérdida de expresión. Además, encontramos que estos dos genes están metilados simultáneamente en el 40% de los tumores analizados. Tomados en conjunto, nuestros resultados indican en primer lugar que la pérdida de expresión por metilación de PENK y GSTM2 podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, y en segundo lugar que la metilación conjunta de estos dos genes podría ser un nuevo biomarcador para la detección precoz del cáncer de próstata.

P21r-33

Unveiling a new mechanism of regulation of angiogenesis through translational regulation by the CPEB family of proteins

Vittorio Calderone¹, Esther Garcia Pras², Jaume Bosch², Mercedes Fernández², Javier Gallego Pinos² y Raúl Méndez¹

¹*Institut of Research in Biomedicine, IRB, Barcelona,*
²*IDIBAPS. Liver Unit-Hospital Clínic, CIBEREHD, and Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona*

Gene expression is regulated at multiple levels, including the translation of mRNAs into proteins. The translational control of stored mRNAs represents an efficient way to rapidly increase the cellular concentrations of proteins, regulate the homeostasis and modulate transient and permanent changes in cell biology. One of the best characterized mechanisms of translational regulation involves changes in the poly (A) tail length, mediated by the CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) family of proteins. CPEB regulates the translation of CPE containing mRNAs in germ cells, fibroblast and neurons, driving both meiotic and mitotic progression and modulating the synaptic plasticity. The aim of this study is to assess the role of CPEB1 and CPEB4 in angiogenesis, through the translational regulation of the pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF). Using portal vein hypertension model, we observed a correlation between the activation of CPEB1, synthesis of CPEB4 and the, nuclear and cytoplasmic processing of the VEGF mRNA with its consequent translational activation.

To better define the mechanistic relevance of these correlations, we have implemented an in vitro model of tubulogenesis using the murine endothelial cell line H5V. In this model we found that CPEB1 and CPEB4 sequentially, and coordinated through a positive translational feed back loop, regulate alternative nuclear and cytoplasmic polyadenylation of VEGF mRNA, which in turn are essential for the synthesis of VEGF and the formation of endothelial tubular structures. Thus unveiling a new mechanism of regulation of angiogenesis through translational regulation by the CPEB family of proteins.

P21e-34

Perfil de expresión de microRNA en cáncer de vesícula biliar

Pablo Letelier Arias¹, Patricio López Mendez¹, Pamela Leal Rojas¹, Patricia García Muñoz¹, Hector Alvarez² y Juan Carlos Roa Strauch¹

¹*Universidad de La Frontera, Facultad de Medicina, Departamento de Patología Molecular, Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN), Temuco (Chile),* ²*Department the Pathology, Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD (USA)*

El cáncer de la vesícula biliar (CVB) es uno de los tumores más frecuentes en Chile. No obstante, su diagnóstico sigue siendo tardío, traducándose en mal pronóstico. Los microRNA son genes no codificantes involucrados en el silenciamiento postranscripcional. La expresión anormal de éstos puede ser de gran utilidad para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Mediante la plataforma de *microarray* Thermo Scientific Dharmacon[®] se obtuvo el perfil de expresión de miRNA en CVB. Se compararon 6 muestras de tejido normal y 6 tumorales, obteniéndose expresión diferencial de 481 miRNA, de los cuales 108 estaban reprimidos (Q-value $\leq 0,01$). Para la validación de los resultados se seleccionaron 8 de ellos: miR-1, miR-29c, miR-126, miR-133a, miR-133b, miR-143, miR-145 y miR-148 que presentaron un fold change ≥ 2 y que según el análisis *in silico* estarían regulando genes altamente expresados en CVB. La validación de la subexpresión fue realizada mediante qRT-PCR en tejido congelado de vesícula biliar (8 tumores y 3 normales). Los resultados indican que miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-145 se encuentran reprimidos en tumor ($p < 0,005$), sugiriendo un importante rol de estos microRNA en la carcinogénesis de la vesícula biliar.

P. Otros

P-1

Determinación de la expresión de FUCA1 en pacientes con cáncer colorrectal mediante qPCR

Olalla Otero-Estévez, Mónica Martínez-Fernández, María Paez de la Cadena, Javier Rodríguez-Berrocal y Vicenta Martínez-Zorzano

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Vigo

Una de las características fenotípicas de las células tumorales es la alteración de la fucosilación de los glicoconjugados de la superficie celular que tiene un papel importante en los procesos de transformación celular y metástasis. La α -L-fucosidasa es el enzima responsable de la eliminación de los residuos de fucosa de los glicoconjugados. Nuestros estudios previos han demostrado una disminución de la actividad de la α -L-fucosidasa en el tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal (CCR) en comparación con la mucosa sana. El objetivo de este trabajo es determinar si la menor actividad de este enzima en los tumores se debe a una menor expresión del gen codificante, FUCA1.

Hasta el momento se han incluido en el estudio 17 pacientes con CCR en distinto estadio de Dukes, de los que se disponía de biopsias de tumor y de mucosa sana. Se aisló el ARN total que se retrotranscribió a DNAc y se determinó la expresión del gen FUCA1 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Para cuantificar la expresión de FUCA1 es necesario normalizarla frente a la de genes de referencia. Por ello, se validaron 5 posibles genes de referencia descritos en la bibliografía (B2M, GAPDH, HPRT1, PPIA, RPLP0). Utilizando los programas geNorm y NormFinder encontramos que los genes de referencia adecuados en tejido colorrectal eran RPLP0 y HPRT1. Considerando dichos genes y empleando el programa REST, los resultados iniciales indican que no existen diferencias significativas en la expresión de FUCA1 en el tejido tumoral comparado con la mucosa sana. En los mismos pacientes se determinará la cantidad de proteína α -L-fucosidasa mediante western blot.

Nota: Agradecimientos: Este trabajo fue subvencionado parcialmente por la Xunta de Galicia (10 PXIB 310 215 PR) y Fondos FEDER.

P-2

Using artificial oil bodies to understand the NMR-visible lipids in C6 glioma cells

Juana Martín-Sitjar¹, Teresa Delgado-Goñi¹, Miquel Cabañas² y Carles Arús³

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Servei de RMN, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ³CIBER-BBN, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

¹H NMR spectra of many biological samples show prominent resonances from fatty acyl (FA) chains of neutral lipids, the “NMR visible mobile lipids” (ML). ML have been proposed as biomarkers associated with malignancy and cell death, or cell differentiation and proliferation rate changes. We have investigated possible biophysical causes for the variability of its detection in cells. For this we have acquired High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) spectra from C6 glioma cells, and artificial oil bodies (AOB) as models of cytosolic lipid droplets (LD).

Using C6 cells at day 4 (log phase) and day 7 (postconfluent) and AOB prepared with caleosine (50-200nmØ) or oleosine (0.2-2µmØ) as models, we acquired HRMAS spectra at different spinning rates between 500Hz and 15,000Hz and classical high resolution NMR spectra at 20Hz, all at 37°C.

Sample spinning at 15,000Hz increased by 2.5 and 4.7 fold the area of resonances corresponding to ML at 0.88 (methyl of FA) and 1.28ppm (methylene of FA), respectively for day 4 C6 cells while an increase of 2.5 fold at 0.88ppm and 4.0 fold at 1.28ppm was detected for day 7 cells. These changes were reversible upon low speed spinning.

For caleosine AOBs the area increase between 500Hz and 15,000Hz was about 1.4 fold both at 0.88 and 1.28ppm. For oleosine AOBs the increase was 1.3 fold at 0.88ppm while at 1.28ppm it was 1.1 fold. The HRMAS effect was already maximal at speeds equal or above 3,000Hz.

In summary, ML can be reversibly mobilized in C6 cells by high-speed HRMAS. Our AOB studies demonstrate that part of the FA chain pool of neutral lipid inside freely tumbling small LDs in cells could be “invisible” under standard high resolution liquid state NMR or in vivo studies, while HRMAS at moderate speed (3,000Hz) would unveil this content.

P-3

Implicación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en la función del espermatozoide de cerdo

María Julia Bragado, Ana Hurtado de Llera¹, David Martín-Hidalgo¹, María Cruz Gil² y Luis Jesús García-Marin²

¹*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura, Cáceres,*

²*Grupo de Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP). Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Cáceres*

El metabolismo celular está regulado por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que funciona como un sensor de la carga energética celular. Hasta la fecha, los estudios relativos a la AMPK se han realizado en células somáticas, y no hay trabajos en la célula germinal masculina. Nuestro objetivo es estudiar la implicación de la AMPK en la función de la célula germinal masculina de mamíferos. Los espermatozoides, aislados a partir de eyaculados de cerdo, se incubaron en un medio basal (sin Ca^{2+} ni HCO_3^-) en presencia o ausencia de un inhibidor específico de la AMPK, compuesto C (CC 30 μM) durante 2h ó 24h y a 17°C ó 38°C. Mediante citometría de flujo se analizaron los siguientes parámetros indicativos de la funcionalidad del espermatozoide: viabilidad, potencial de membrana mitocondrial, desorganización de la membrana plasmática y reacción acrosómica (sondas SYBR, JC-1, MD450 y PNA respectivamente). Los resultados indican que a tiempos cortos de tratamiento (2h) a 38°C el CC no tiene efecto en ninguno de los parámetros estudiados. A tiempos mayores de incubación (24h) el CC incrementa significativamente el porcentaje de espermatozoides con desorganización de la membrana plasmática (3 veces) o que han experimentado reacción acrosómica (1,5 veces). Paralelamente el CC reduce el porcentaje de células viables en un 48% y el de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial en un 37%. En conclusión, nuestros datos sugieren que la quinasa sensora del estado energético celular, AMPK, está implicada en varios procesos celulares que regulan la función de la célula germinal masculina.

Nota: Financiado por MICINN (AGL2010-15188) y Junta de Extremadura JUEX-(GR10156; D. Martín-Hidalgo es becario predoctoral (JUEX) España.

P-4

La inhibición farmacológica del metabolismo de los ácidos grasos disminuye la proliferación de las células de mieloma múltiple

José Manuel Tirado Vélez, Irene Cozar Castellano y Germán Perdomo Hernández

Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

El mieloma múltiple (MM) es un desorden maligno de las células plasmáticas sin que exista tratamiento eficaz. Se ha sugerido que el metabolismo de los ácidos grasos en tumores es vital para la supervivencia celular. Se desconoce el impacto del metabolismo de los ácidos grasos sobre la proliferación de las células de MM. Hipotetizamos que la inhibición farmacológica del metabolismo de los ácidos grasos disminuye la proliferación en células de MM. Empleamos líneas celulares (U266B1, NCI-H929, RPMI-8226) y cultivos primarios. La oxidación de ácidos grasos (OAG) se inhibió empleando etomoxir (ETX; 5-200 μM) y la síntesis de novo de ácidos grasos (SAG) se inhibió empleando orlistat (ORL; 10-20 μM). Se cuantificó la OAG y la SAG por técnicas isotópicas. El ciclo y la apoptosis celular se analizaron por citometría de flujo. La proliferación se midió por incorporación de 3H-timidina. Las proteínas de ciclo celular se analizaron por western blot. El ETX inhibió un 90% la OAG y redujo un 30% la proliferación celular. El ORL inhibió un 80% la SAG y redujo un 50% la proliferación. El tratamiento conjunto de ETX y ORL inhibió la proliferación un 75%. El ETX u ORL no alteró la apoptosis. Coincidiendo con la reducción en la tasa de proliferación, el ETX y ORL redujeron un 10-25% el número de células en fase S. El efecto del ETX se asoció con una reducción en los niveles de Ciclina-D2, CDK6, p21 y la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (ppRb). El ORL disminuyó los niveles de p21 y la ppRb. Además, ETX y ORL redujeron un 30% la proliferación en cultivos primarios de MM. Por lo tanto, la proliferación de las células de MM está regulada por la capacidad de oxidar y sintetizar ácidos grasos. Hemos patentado el uso del ETX y ORL como fármacos potenciales en el tratamiento del MM.

P-5

Producción de biodiésel catalizada por CALB inmovilizada a nanopartículas magnéticas

Álvaro Cruz Izquierdo, Zuriñe Anton Helas, Enrique Angulo Picó, María Jesús Llama Fontal y Juan Luis Serra Ferrer

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad País Vasco (UPV/EHU), Bilbao

La lipasa de *Candida antarctica* B (CALB, EC 3.1.1.3) es un enzima frecuentemente empleado por su capacidad para catalizar un gran número de reacciones de (*trans*)esterificación de interés industrial en medios orgánicos, produciendo compuestos de valor comercial como el biodiésel. De cara a su utilización a escala industrial se requiere inmovilizar adecuadamente el enzima para aumentar su estabilidad, facilitar su recuperación de la mezcla de reacción y aumentar el número de reutilizaciones. Las nanopartículas magnéticas (MNP) son un soporte de inmovilización idóneo para cumplir con estos requisitos, al presentar una elevada superficie por unidad de volumen, así como una rápida y sencilla recuperación del medio de reacción aplicando un campo magnético externo.

En este trabajo, se han sintetizado MNP de magnetita, funcionalizado sus superficies con grupos amino y, finalmente, inmovilizado covalentemente CALB mediante reactivos entrecruzantes. Entre otros factores, y con el fin de orientar el enzima para facilitar el acceso del sustrato al centro activo y aumentar la velocidad de reacción, se ha estudiado el efecto de diferentes detergentes durante el proceso de inmovilización. Se ha evaluado la capacidad de este catalizador robusto en la producción enzimática de biodiésel. Tras estudiar diferentes factores que afectan la reacción de transesterificación, los mejores resultados se han obtenido con una relación aceite vegetal:2-butanol (1:6 mol:mol) en presencia del complejo MNPs-CALB a una proporción del 5% peso catalizador/peso aceite. En estas condiciones, y a 40°C, se ha conseguido convertir en biodiésel hasta el 80% del aceite ofrecido.

Nota: Trabajo subvencionado por el Gobierno Vasco (SAIOTEK 09/NANOMAG) y la UPV/EHU (GIU07/55). A.C. es becario predoctoral de la UPV/EHU.

P-6

Oxidative stress and inflammation in Alzheimer's Disease

D. Aguirre-Rueda, C. García-Lucerga, A. Sanchez-Pérez y S.L. Valles

Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia

Many studies have shown the relationship between oxidative stress and Alzheimer's disease (AD). The hallmark in AD is both accumulation of β -amyloid plates and the presence of TAU protein inside neurons. Furthermore, glial cell activation, occurs after plates appear in brain damaged, producing astrogliosis and microglia activation. Our group has shown oxidative stress and inflammation in neurons and astrocytes in primary culture. Using microarray and RT-PCR we analyse gene expression of oxidative stress and inflammation genes. Also, by western-blot we determine protein expression of inflammation and oxidative stress markers in transgenic (APP/Preseniline I) compared with wild type mice. Our results show an induction of pro-inflammatory mediators and reduction of anti-inflammatory mediators in transgenic mice compared with wild type. Also pro-oxidants proteins are increased and anti-oxidants proteins are decreased in transgenic mice compared with wild type. Our results demonstrate an unbalance between oxidants and antioxidants proteins and also an unbalance between inflammatory and anti-inflammatory mediators in Alzheimer's disease.

Pe-7

Identification of cancer stem cells in human solid tumors and their application as personalized model for chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer

Ana M^a Martínez Arroyo¹, Cristóbal Aguilar Gallardo¹, Juan Hidalgo², Santiago Domingo² y Carlos Simón¹

¹*Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia,*
²*Hospital Universitario La Fe, Valencia*

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecological malignancies being the fifth most common cancer in women. Epithelial Ovarian Carcinoma (EOC) is the most frequent variety being detected at an advanced stage (III or IV) with disseminated disease. The standard therapy in these patients includes aggressive cytoreductive surgery and chemotherapy which is successful in reducing tumor mass, but most women maintain the residual disease being their survival rate of only 33%. Accumulated evidences demonstrate resistance of Cancer Stem Cells (CSC) to conventional therapies, as CSC possess several key properties including self-renewal, unlimited proliferative potential and capability to reproduce the human tumor in an immunodeficient animal model. The aim of this study is to isolate and obtain an in vitro human ovarian CSC model to use it as a new drug screening

platform as well as a new therapeutic approach. Drugs that result effective could then be tested in a new in vivo model also developed from human ovarian CSC in order to study their potential effects in invasiveness and metastasis. With this objective, we have developed a culture method that simulates the characteristic microenvironment of CSC, preserving stemness criteria. As the microenvironment surrounding CSC is crucial for maintaining the stem cell-like characteristics that lead tumor growth, this method would allow us to investigate in vitro and in vivo the mechanisms underlying tumor development, metastasis and invasive capacity as well as chemoresistance in a personalized model of EOC, moving towards an individualized model of chemotherapy resistance.

P-8

DOR/Tp53inp2 and Tp53inp1 encode for dual regulators of autophagy and transcription

Ana Sancho¹, Jordi Duran¹, Antonio Garcia-España², Caroline Mauvezin¹, Endalkachew A. Alemu³, Trond Lamark³, Maria J. Macías⁴, Rob DeSalle⁵, Miriam Royo⁶, David Sala¹, Manuel Palacin¹, Terje Johansen³ y Antonio Zorzano¹
¹*Institute for Research in Biomedicine Barcelona, Universidad de Barcelona, Barcelona.* ²*Institut d'Investigació Sanitària Rovira i Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.* ³*Institute of Medical Biology, University of Tromsø, Tromsø (Norway).* ⁴*Institute for Research in Biomedicine Barcelona, Barcelona.* ⁵*Sackler Institute for Comparative Genomics, American Museum of Natural History, New York (USA).* ⁶*Combinatorial Chemistry Unit, Barcelona Science Park, Barcelona, Barcelona*

Human DOR/Tp53inp2 shows a bifunctional role as a stimulator of autophagy and gene transcription. Here we have performed structure/function analysis for DOR, after identification of conserved regions in the DOR gene family by phylogenetic reconstructions. We show that DOR is present in metazoan species. Invertebrates harbor only one gene, DOR/tp53inp2, and in the common ancestor of vertebrates tp53inp1 may have arisen by gene duplication. We show that human Tp53inp1 regulates autophagy and that different DOR and Tp53inp1 proteins display transcriptional activity. DOR and Tp53inp1 proteins share two highly conserved regions. DOR mutation of conserved hydrophobic residues in region 1 reduces transcriptional activity, and blocks nuclear exit and autophagic activity. We also identify a LC3-interacting motif (LIR) in region 1 of DOR and Tp53inp1 proteins. DOR mutation of conserved acidic residues in region 2 reduces transcriptional activity, impairs nuclear exit in response to

autophagy activation, and collapses autophagosomes. In all, our data uncover new dual regulators of transcription and autophagy, and identify two conserved regions that are key in autophagy and transcription.

P-9

Expresión de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en la célula germinal masculina: Posible función en la regulación de la motilidad del espermatozoide

Ana Hurtado de Llera, David Martín-Hidalgo, María Cruz Gil, Luis Jesús García-Marín y María Julia Bragado

Grupo de Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP). Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Cáceres

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) actúa como un sensor que detecta el estado energético celular y de forma consecuente regula el metabolismo. Hasta la fecha, los estudios de AMPK se han realizado en células somáticas, no existiendo ningún trabajo sobre AMPK en células germinales. Por lo tanto, nuestro objetivo es estudiar la expresión y posible función de la AMPK en la motilidad de la célula germinal masculina. La expresión de AMPK en espermatozoides de cerdo, aislados a partir de eyaculados, se estudió por Western Blot. Para analizar la motilidad de los espermatozoides en presencia o ausencia del inhibidor específico de la AMPK, compuesto C (CC), se usó el sistema de análisis seminal ISAS. Los resultados indican que los espermatozoides expresan la proteína AMPK y que lo hacen en niveles relativamente mayores que en células somáticas. El análisis de motilidad revela que el tratamiento de espermatozoides con CC (30µM) reduce hasta un 83% el número de espermatozoides móviles según el tiempo analizado. El inhibidor de AMPK reduce el número de espermatozoides rápidos (velocidad media >80µm/s) de forma dependiente del tiempo. El tratamiento de 24h con CC reduce significativamente las velocidades espermáticas analizadas: rectilínea (inhibe un 61%), curvilínea (45%) y velocidad promedio (53%), a la vez que inhibe la frecuencia de batido de la cola del espermatozoide (50%). En conclusión, este trabajo indica que la quinasa sensora del estado energético celular AMPK se expresa en espermatozoides y sugiere que la AMPK está implicada en la regulación de la motilidad, proceso necesario para que el espermatozoide realice su función esencial, la fecundación.

Nota: Financiado por MICINN (AGL2010-15188) y JUEX (GR10156); D. Martín-Hidalgo es becario predoctoral (JUEX) España.

P-10

Evaluación del potencial proliferativo, de diferenciación y terapéutico de las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (HWJSC) mediante análisis genéticos

Kevin Doello González, Víctor Carriel, Ingrid Garzón, Miguel Alaminos Mingorance y Antonio Campos Muñoz

Grupo de Ingeniería Tisular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada

Introducción: En el presente estudio se pretende evaluar el carácter multipotencial de las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (HWJSC). Para ello se llevaron a cabo análisis genéticos por *microarrays* a poblaciones celulares de HWJSC en cultivos 2D.

Método: Se realizó un cultivo primario y seis subcultivos consecutivos de las HWJSC. El RNAm se obtuvo mediante el sistema comercial Quiagen RNeasy System. Tras ello el RNAm fue convertido en DNAc usando una transcriptasa inversa, y posteriormente en RNAc utilizando UTP y CTP marcados con biotina. Los RNAc fueron hibridados contra los que constituyen los chips de *microarray* de Affimetrix Human Genome U133.

Resultados: Se consideran sobreexpresados aquellos genes cuya expresión es mayor a 1000 unidades fluorescentes, comprobándose que cuanto más tardío es el subcultivo, la sobreexpresión génica es menor. Puede verse una transcripción aumentada de los genes ACTN1, ACTB1, ACTG1 y VIM. En cuanto a marcadores de superficie, sobreexpresan CD164, CD44, CD59, CD63, CD81 y CD99. No expresan CD34. Hay una elevada transcripción de PCNA, carioferinas (KPNA2, KPNA4 y KPNB1) y RAN. También están sobreexpresados HSP90 y BCLAF1. Si analizamos el potencial de diferenciación, expresan los receptores EGFR, IGF2R y TGFBR1 y 2, siendo muy elevada en NGFRAP1. También sobreexpresan NGRN, DBI, IGFBP7, TGF – B, ENO1, CALM1, ALDOA y GADPH, IL-8, VEGFA, SERPINE1, POSTN y HIF1A. El nivel de expresión del MHC – I decrece con el paso de los subcultivos.

Conclusión: Los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo por *microarrays* ponen de evidencia la gran capacidad proliferativa y de diferenciación de las HWJSC y, con ello, su elevado potencial terapéutico.

P-11

Funcionalización de nanopartículas magnéticas con la poli(3-hidroxiocanoato)-despolimerasa de *Pseudomonas putida* KT2442 (pIZPZ)

Noelia Villarroel Rodríguez, Ainhoa Lezamiz Herrero, Álvaro Cruz Izquierdo, Marta Santos Cuesta, Joana Gangoiti Muñecas, María Jesús Llama Fontal y Juan Luis Serra Ferrer

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad País Vasco (UPV/EHU), Bilbao

La funcionalización de nanopartículas magnéticas (MNP) permite su unión covalente a enzimas. El carácter superparamagnético del nanosoporte confiere al biocatalizador inmovilizado la posibilidad de recuperarlo fácilmente y reutilizarlo en nuevos ciclos catalíticos. Además, la inmovilización del enzima a soportes sólidos aumenta significativamente la estabilidad y vida útil del biocatalizador. Las poli(R)-hidroxialcanoato (PHA) despolimerasas extracelulares catalizan la hidrólisis de PHA, biopolíesteres que acumulan muchos microorganismos al crecer en situaciones de estrés nutricional. La hidrólisis enzimática de PHA conduce a la obtención de monómeros quirales de ácido (R)-hidroxialcanoico. Estos compuestos han adquirido un gran interés por sus potenciales aplicaciones en biomedicina y en la industria farmacéutica, además de constituir sillares estructurales para sintetizar otros plásticos biodegradables que puedan sustituir a los convencionales derivados del petróleo.

Se han sintetizado MNP de magnetita, se ha dotado a su superficie de grupos amino y, finalmente, se les ha unido covalentemente la PHA despolimerasa purificada de *Pseudomonas putida* KT2442 (pIZPZ). La inmovilización se ha optimizado variando la concentración de agente entrecruzante, tiempo y temperatura de la reacción, y siguiendo el rendimiento de proteína y actividad retenida en el nanosoporte magnético. El enzima inmovilizado se ha empleado para hidrolizar poli(3-hidroxiocanoato) (PHO) y se han caracterizado los productos quirales.

Nota: Subvencionado por SAIOTEK 09/NANOMAG y GIU07/55. *P. putida* ha sido cedida por MA Prieto (CIB-CSIC, Madrid) y el PHO por Biopolis (Valencia) y CPI (Newcastle). NV, AL, AC, MS y JG son becarios predoctorales de GV, UPV/EHU o MEC.

P-12

Implication of p38 γ and p38 δ in colorectal cancer associated with colitis

Paloma del Reino Fernández¹, María Isabel Cerezo Guisado¹, Elena Collantes Bellido² y Ana Cuenda Méndez¹

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid,

²Servicio de anatomía patológica, Hospital Universitario La Paz, Madrid

p38MAPK pathways link extracellular signals to the machinery that controls fundamental cell processes such as growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis. There are four members of p38MAPK family: p38 α , p38 β , p38 γ and p38 δ . It is well documented that p38 α has crucial role in inflammation and malignant transformation but little is known about the functions of other alternative p38MAPK isoforms. Here we have studied the implication of the p38 γ and p38 δ isoforms in models of ulcerative colitis (UC) and colorectal cancer associated with colitis (CAC), using p38 γ , p38 δ and p38 γ/δ null mice. Our findings show that the CAC model in p38 γ/δ -deficient mice produced larger, more numerous tumors than in other genotypes studied. In contrast, the UC model produced greater damage in wild type than in p38 γ/δ knockout mice.

P-13

Incremento de transcripción del enzima pro-metastático heparanasa humana inducido por la presencia del propio enzima en el medio extracelular

Ainara Crespo Susperregui¹, Ivan Fernández Vega², Olivia García Suárez³, Sonia Castañón de la Torre¹ y Luis M. Quirós Fernández⁴

¹Departamento de Biotecnología. Neiker Tecnalia - Centro de Arkaute, Vitoria - Gasteiz, ²Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, ³Departamento de Morfología y Biología celular. Universidad de Oviedo, Oviedo, ⁴Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Oviedo

El Heparán sulfato (HS) es un heteropolisacárido complejo implicado en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. La heparanasa (HPSE) es una endo- β -D-glucuronidasa capaz de hidrolizar las cadenas de HS en enlaces concretos, originando fragmentos de tamaño comprendido entre 10 y 20 unidades sacarídicas. Estos

fragmentos incluyen dominios con actividades biológicas, por lo que la HPSE participa en procesos esenciales, incluyendo morfogénesis, desarrollo, inflamación, autoinmunidad, angiogénesis o metástasis tumoral. Los sistemas responsables de la inducción de la HPSE no son bien conocidos, aunque se han descrito diversos mecanismos implicados, incluyendo metilación del DNA, receptores de estrógenos o diversos factores de transcripción.

Para analizar la capacidad de la HPSE para inducir su propia transcripción, la hemos sobreexpresado 724 veces en células 293-EBNA, obteniendo una sobreexpresión de. La HPSE sigue una evolución normal, apareciendo como proenzima en el medio extracelular y como forma procesada catalíticamente activa en el interior.

Cuando células control se incubaron en medio condicionado de sobreproductoras, la transcripción de HPSE aumentó más de 12 veces. La preincubación del medio condicionado con anticuerpos contra la forma procesada del enzima redujo la sobreexpresión a sólo 2,4 veces, siendo virtualmente anulada por anticuerpos frente a la forma proenzimática.

La HPSE humana fue expresada en células de *E. coli*. El aislamiento de la proteína y su adición a células control también fue capaz de inducir la sobreexpresión de la HPSE aunque con menor intensidad. Todos estos datos apuntan a que la presencia de HPSE extracelular es capaz de inducir la transcripción de su propio gen.

P-14

Desarrollo de un método a punto final para la evaluación de la actividad lipasa

David Palacios, María D. Busto, Manuel Pérez-Mateos, María C. Pilar-Izquierdo y Natividad Ortega

Área de Bioquímica y Biología Molecular. Dpt. Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos, Burgos

Para la evaluación de la actividad lipásica han sido descritos numerosos ensayos que difieren en su principio básico, selectividad de sustrato, sensibilidad y aplicabilidad. Mientras que los ensayos cinéticos presentan limitaciones como la imposibilidad de determinar la actividad a altas concentraciones de sustrato y a valores de pH ácidos, los ensayos a punto final requieren el bloqueo de la actividad de reacción tras finalizar el tiempo de incubación para conseguir resultados reproducibles. En este trabajo se analizaron diferentes métodos a punto final descritos en

bibliografía. Los enzimas seleccionados fueron Lipolase procedente de *Thermomyces lanuginosus* (Novozyme) y Lipase PS de *Burkholderia cepacia* (Amano) y, el sustrato utilizado *p*-nitrofenil palmitato. Los resultados indicaban que transcurridos 10 min después de parar la reacción mediante ebullición o enfriamiento en hielo, la actividad se incrementaba un 170 y 416% para el enzima Lipolase y, un 119 y 387% para Lipase PS, respectivamente. La adición de NaOH o THAM hidrolizaba el sustrato, y la de etanol-acetona no detenía la reacción. De los resultados obtenidos se propone como una nueva alternativa la adición de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico). Este reactivo conseguía detener la reacción por desproteinización de la mezcla de reacción. Adicionalmente, se determinaron las condiciones de ensayo (5 min de incubación), la precisión y la sensibilidad del método. El coeficiente de variación obtenido no superaba el 3%, frente al 26% en el ensayo cinético, o el 17% cuando la reacción era detenida por ebullición. Finalmente, se estudió el efecto de diferentes detergentes (goma arábica, triton X-100, SDS, colato sódico, Tween 80) sobre la actividad lipolítica.

P-15

Cinéticas de inactivación térmica de lipasas comerciales libres e inmovilizadas

L. Sáez-Mata, D. Palacios, N. Ortega, C. Pilar-Izquierdo, M. Pérez-Mateos y M.D. Busto
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los alimentos. Área de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos, Burgos

Además de su importancia biológica, las lipasas tienen gran potencial en áreas como la tecnología alimentaria y la industria química y farmacéutica. Las razones para su enorme potencial biotecnológico residen en que son estables en presencia de disolventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato, y son altamente enantio- y regioselectivas [1]. El objetivo central del presente trabajo es el estudio comparativo de la actuación de diversas lipasas comerciales tanto libres como inmovilizadas frente a la acción de la temperatura. Los resultados obtenidos demostraron que las lipasas libre (Lipase PS, *Amano*), inmovilizada en diatomeas (Lipase PS D-I, *Amano*) o en soporte cerámico (Lipase PS C-I, *Amano*) procedentes de *Burkholderia cepacia* presentaban óptimos de actuación a temperaturas de 60-70°C, 50-70°C y 70-90°C, respectivamente, mientras que las procedentes de *Rhizomucor miehei* libre (Palatase, *Novozymes*) e inmovilizada en resinas de intercambio iónico (Lipozyme, *Novozymes*) eran más efectivas a temperaturas entre 30 y 50°C. En las cinéticas de inactivación térmica, a la temperatura de 70°C la lipasa libre de *Burkholderia*

presentaba dos tramos lineales diferenciados lo que implicaba la presencia en el preparado comercial de al menos dos isoenzimas con diferente estabilidad al tratamiento térmico. Por una parte, una isoenzima lábil con una vida media a 70°C de 17,55 min ($R^2=0,9753$), y otra más termorresistente con una vida media de 79,67 min ($R^2=0,9458$). La lipasa de *Rhizomucor* presentaba una vida media a dicha temperatura de 18,68 min ($R^2=0,943$) en un único tramo lineal.

[1] Hasan F, Shah A y Hameed A *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39(2): 235-251.

Pr-16

Beyond networking: Microtubule destabilization via Plectin, an intermediate filament-associated cytolinker

Rocio Garcia de la Cruz Valencia, Gernot Walko, Lubomir Janda, Eva Mihailovska y Gerhard Wiche
Department of Biochemistry and Cell biology. Max F. Perutz Laboratories. University of Vienna, (Austria)

Microtubules (MT) are subject to dynamic instability, a process characterized by regulated transitions of assembly and disassembly states. We report that plectin 1c (P1c), one of the multiple isoforms of the intermediate filament (IF)-binding protein plectin, destabilizes MT. P1c targets MT via an isoform-specific N-terminal domain and sequesters MAP2c and Tau via a nearby SH3 domain that was found to antagonize the MT-stabilizing and assembly-promoting function of MAP. Live imaging of isoform P1c-deficient keratinocytes revealed increased assembly and decreased disassembly rates of MT. P1c-deficient keratinocytes show aberrant mitotic spindles and diminished growth rate, as well as higher glucose uptake due to an accumulation of glucose transporter proteins at the membrane. Our results open an exciting new perspective on IF-function and crosstalk between cytoarchitecture and cell metabolism.

P-17

Guessing a function for the *S. cerevisiae* YER076C ORF

Elena Jiménez-Martí, María Guirola y Silvia Atrian
Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona

Zinc is an essential metal for all organisms participating either in protein structure or in protein function. Efficient homeostasis of this metal is necessary, and

the *Saccharomyces cerevisiae* yeast is a good organism in which its study can be approached.

During the last years our group has been working in yeast response to high zinc concentration. We identified some genes involved in the correct growth of yeast in such conditions, and some other genes involved in tolerance to high zinc levels [1]. It is worth to mention that the absence of *pif1* gene brings about a deregulation of both zinc and iron homeostasis [2]. In the microarray experiments carried out with the *pif1* null mutant, among the genes that were more expressed in the mutant, we focused on *yer076c*, an unknown-function ORF, coding a protein localized in the mitochondrial membrane. Our intention is to bring some light about the molecular processes in which *Yer076c* could be involved.

[1] Pagani, M. A., Casamayor, A., Serrano, R., Atrian, S. and Ariño, J. *Disruption of iron homeostasis in Saccharomyces cerevisiae by high zinc levels: a genome-wide study* 2007; 65: 521-537.

[2] Guirola, M., Barreto, L., Pagani, M. A., Romagosa, M., Casamayor, M., Atrian, S. and Ariño, J. *Lack of DNA helicase Pif1 disrupts zinc and iron homeostasis in yeast* *Biochemst* 2010; 432: 595-605.

P-18

Seguimiento de la adaptación muscular en diabéticos tipo 2 a entrenamientos de fuerza y resistencia

Joan Aureli Cadefau¹, Roser Cussó², Mario Guerrero², Andreu Farran³, M^a Antonia Lizarraga⁴, Imma Palma³, Dolors Zomeño³, M^a Milagros Antón⁵, Laura Brugnara⁶, Serafín Murillo⁶ y Anna Novials⁶

¹Institut Nacional Educació Física de Catalunya (INEFC) - UB, Barcelona, ²Ciències Fisiològiques I. Facultat de Medicina. UB, Barcelona, ³Departament de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmàcia. UB, Barcelona, ⁴Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina. UB, Bellvitge, ⁵Universidad Pública de Navarra, Pamplona, ⁶CIBER, Barcelona

Los pacientes diabéticos tipo 2 presentan un mayor número de fibras musculares de tipo II, y un menor número de fibras de tipo I, este hecho se puede relacionar con una menor absorción de la glucosa por el músculo.

Mediante un período de entrenamiento de 4 meses de duración, con ejercicios de fuerza y resistencia se pretende modificar el porcentaje de tipos de fibras musculares en los diabéticos tipo 2, disminuyendo las de tipo II y aumentando las I, más sensibles a la insulina.

La valoración de las isoformas musculares de miosina rápida y lenta en sangre permite realizar el seguimiento de la adaptación muscular al trabajo muscular.

Sujetos controles y diabéticos (45-70 años) se han sometido a una prueba de esfuerzo agudo antes y al final del entrenamiento. En el entrenamiento se ha usado el pedaleo de bicicleta como ejercicio de resistencia y el press de banca como fuerza anaeróbica. Antes y después del entrenamiento se ha valorado la composición corporal, la producción de fuerza, la capacidad cardiorrespiratoria, la ingesta de vitamina D, y los niveles de glucosa, hemoglobina glucosilada, vitamina D y las isoformas de miosina lenta y rápida musculares en sangre.

Los resultados muestran que el efecto del entrenamiento, no modifica la composición corporal, (peso, perímetro cintura, grasa total y grasa abdominal), mientras que la fuerza y la potencia máxima aumentan. En cuanto a la vitamina D, la ingesta media cubría únicamente un 60% de las recomendaciones nutricionales actuales, observándose concentraciones sanguíneas muy bajas en el 50% de los individuos.

Los valores en sangre de las isoformas musculares de miosina rápida y lenta aumentan con el entrenamiento, observándose una pequeña adaptación en la calidad de las fibras en los diabéticos.

P-19

Minimization of post-mortem metabolome changes in mouse glioma samples by prior focused microwave irradiation.

Myriam Dávila Huerta¹, Ana Paula Candiota² y Carles Arús²

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, ²Centre Investigació Biomèdica en Xarxa en Bioingeniería, Biomaterials i Nanomedicina (CIBER-BBN) Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès

High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) magnetic resonance spectroscopy is a versatile tool to examine tissue biochemistry in a non destructive way. However, the biochemical profile may be affected by experimental factors such as the period of ischemia, acquisition length and sample temperature. To minimize biochemical changes during the HRMAS experiments, most studies are performed at low temperatures, but even then biological processes do not stop. Besides, physiological temperature recording allows better detection of mobile lipids (ML) and Choline-containing compounds (ChCCp)

which are cell proliferation markers in brain tumour tissue. Then, focused microwave (FMW) irradiation arrests metabolic processes by heating the tissue in milliseconds. Accordingly we herewith report a strategy to minimize the metabolome changes when acquiring HRMAS spectra from tissue at physiological temperature.

Glioblastoma tumours were induced in 6 mice by stereotactic injection of GL261 cells. Animals were sacrificed and tumour was removed, halved and stored in liquid N₂. One sample aliquot was exposed to FMW irradiation prior to HRMAS while the other half was not. Time-course experiments (374 min at 37°C) were carried out to monitor spectral pattern changes. Differences were assessed with Unianova test while histopathology analysis assessed tissue integrity.

Significant changes were observed in samples without FMW irradiation, e.g. changes related to anaerobic glycolysis, lactate increase, or other related to ChCCp compounds, associated to phospholipases activity. No significant changes were detected in FMW-irradiated samples, indicating that this is a useful method to prevent post-mortem metabolome alteration of the spectral pattern sampled by HRMAS analysis of the intact tissue.

P-20

Development of an improved method to evaluate potential performance of nanoparticle contrast agents for brain tumour detection using mouse brain MRI

Milena Acosta González¹, Teresa Delgado-Goñi², Silvia Lope-Piedrafita³, Ana Paula Candiota¹, Oscar Bomati¹-Miguel⁴, Nuria De Miguel⁵, Marco Marradi⁶, Soledad Penades⁶, Jesus Santamaria⁵ y Carles Arús¹

¹Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad de Bioquímica de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, ³Servicio de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, ⁴Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, CSIC, Madrid, ⁵Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

Universidad de Zaragoza, Zaragoza, ⁶Laboratorio de GlicoNanotecnología, Unidad de Nanomateriales Biofuncionales, CIC biomaGUNE, San Sebastián

Magnetic resonance imaging (MRI) is a powerful, non-invasive technique which plays an important role in tumour

diagnosis. In an MR image, contrast detected among anatomic structures is due to differences in the physical/chemical environment of tissue water protons. These water tissue properties may be modified and image information content can be improved with the use of a contrast agent (CA). We have developed a method to evaluate the potential for improved performance of new CA in mouse brain. Other aims included reducing the amount of CA required in each experiment and reducing also the number of animals required for this study. Commercial CAs were used for method validation. Animals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital, and the CA was injected stereotactically. For positive CA (agent "A"), the amount injected was 5 nmol in gadolinium, whereas for negative CA (agents "B" and "C"), 0.0082 µg in iron diluted in 4 µl of saline solution was used. High resolution MR images were acquired and water signal intensity at each injection point was measured. The expected signal change was clearly visible in all animals. Regarding to the CA performance, significant differences were observed between agent A and Dotarem® CA ($p < 0.05$), whereas for agents B and C no significant difference was detected in comparison with commercial ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) of 50 nm Ø CA. Since CA is injected directly into brain tissue, this ex vivo CA evaluation method should allow us to predict the in vivo performance of a new CA in a more realistic manner than the standard in vitro relaxivity assays. The number of animals used is reduced, as well as the CA amount consumed, 400-fold lower than in vivo studies.

P-21

Role of abnormal extracellular hardening in collagen turnover in lung fibrosis

Alicia Giménez Hidalgo¹, Marta Puig Martínez¹, Roland Galgoczy¹, Antoni Xaubet², Noemí Reguart Aransay² y Jordi Alcaraz Casademunt¹

¹Ciències Fisiològiques I. Facultat de Medicina. UB, Barcelona, ²IDIBAPS, Barcelona

A hallmark of prevalent diseases including fibrosis and tumors is an abnormal tissue hardening concomitant to an overabundance of collagen deposition and a progressive loss of tissue-specific functions. These alterations are particularly clear in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a lethal disease of unknown etiology in which the lung becomes up to 30-fold stiffer than normal lung. We hypothesized that extracellular hardening and collagen deposition are part of a positive feedback loop that renders a stiffened tissue in IPF. To test this hypothesis, we first measured the stiffness of 3D collagen I gels with increasing

collagen concentrations by atomic force microscopy. We found an increase in stiffness with the square of the concentration, revealing that increased collagen deposition is sufficient to induce tissue stiffening. Secondly, we cultured primary human lung fibroblasts from control (CF) or IPF patients (IPFF) on either soft or stiff gels in the presence of TGF- β 1, mimicking the mechanics of normal and fibrotic lung, respectively, and assessed the expression of collagen I (COL1A1) and MMP-1 by qPCR. TGF- β 1 upregulated COL1A1 expression in CF, and this upregulation was slightly higher in the stiffest gels. In contrast, MMP1 followed an inverse pattern compared with COL1A1. This opposite expression patterns were also observed in IPFF, although the global expression levels were higher in IPFF. These preliminary results support our hypothesis, and reveal that a combination of TGF- β 1 and substrate stiffening elicits an imbalance between collagen synthesis and degradation towards collagen deposition, which may drive partially the abnormal tissue hardening that is necessary for IPF progression.

P-22

A combinatorial platform that simplifies the cloning of fusion proteins

Raquel Buj Gómez, Anna M. Planas Obradors y Tomás Santalucía Albi

Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración. IIBB-CSIC/IDIBAPS, Barcelona

Background: Invitrogen's Gateway system provides a restriction enzyme-free system for the cloning of DNA fragments. A report [1] described a way of adapting any existing Gateway-compatible DEST vector for the three-fragment cloning that could be easily adopted for the generation of parts to be used in synthetic biology cloning strategies.

Aims: To construct a library of modules to be used for easily expressing any ORF of interest as a fusion protein in any Gateway destination vector.

Methods: DNA fragments were PCR-amplified and cloned by recombination into plasmids of the Multisite Gateway cloning kit. DEST expression vectors with their own promoters were adapted for three-fragment cloning.

Results: We have generated modular parts of a multisite cloning system that consist of either the fluorescent protein mKate2 or an epitope-tag cassette that can be cloned at the N- or C-terminal end of an ORF.

[1]Magnani E *et al BMC Mol Biol* 2006; 7: 46.

Note: Project funded by grant SAF2008-04515-C02-02 from Ministerio de Ciencia e Innovación. T.S. participates

in the Program for Stabilization of Investigators from the "Generalitat de Catalunya".

P-23

Determination of metabolic volatile organic compounds in exhaled breath of patients with chronic obstructive pulmonary disease by gas chromatography mass spectrometry

Roldán Cortés¹, Ana Guaman², Idoya Agudo², Daniel Calvo³, Antonio Pardo³, Santiago Marco³, Joan Albert Barberà⁴, Federico P. Gómez⁴ y Marta Cascante⁵

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona,

²Artificial Olfaction Group, Inst. for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, ³Intelligent Signal Processing (ISP), Department of Electronics,

University of Barcelona, Barcelona, ⁴Department of Respiratory Medicine, Hospital Clinic, CIBERES, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona,

⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, IBUB, University of Barcelona and IDIBAPS, Barcelona

Introduction: Metabolism generates Organic Volatile Compounds (VOC) detectable in exhaled air. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by increased inflammation and oxidative stress, and there are indications that the pattern of exhaled VOC in COPD can be different from that in healthy patients.

Aims: We present a method to identify VOC profile in breath samples to separate COPD patients from healthy volunteers.

Methods: In a pilot study, 12 COPD patients and 17 controls were evaluated. End-exhaled breath samples were obtained using a breath sampler and transferred to a Tedlar Bag. Solid Phase Microextraction was used to preconcentrate the samples. Analysis was carried out with a Gas Chromatographer coupled to a Mass Spectrometer. MZmine software was used to process the spectra obtained.

Results: Analysis of the spectra showed differences between COPD and healthy VOC profiles, even though variability between subjects is still high.

Conclusions: Pre-concentrated end-exhaled breath VOC analysis using GC/MS is a non-invasive method with promising potential in distinguishing VOC patterns from COPD and healthy breath samples.

Pr-24

Autofagia, una nueva perspectiva en el estudio toxicológico del glifosato

Luis Ramírez Cebollero, Pilar López Aparicio, M. Natividad Recio, Yurena Sánchez López y Miguel Ángel Pérez Albarsanz

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid

El glifosato es probablemente el herbicida de acción directa más utilizado en todo el mundo. La gente puede exponerse a sus residuos mediante prácticas agrícolas o a través de la cadena alimenticia. En cuanto a su toxicidad, hay descritos efectos nocivos en numerosos modelos de estudio no sólo humanos. Entre estos efectos están alteraciones del ciclo celular, inducción de apoptosis y necrosis o modificaciones en la transcripción de genes. Nosotros hemos estudiado la toxicidad del glifosato en las líneas de cáncer de próstata humano PC3 (independiente de andrógenos), y LNCap (dependiente de andrógenos). Los resultados de ensayos de viabilidad, muestran un descenso de hasta un 60% en el número de células tras tres días de tratamiento. El análisis de la apoptosis muestra un incremento de células apoptóticas con respecto del control en ambas líneas. Los ensayos de liberación de Lactato-Deshidrogenasa (LDH) revelan niveles significativos de necrosis en la línea LNCap, pero no así en las células PC3. Un primer estudio del ciclo celular, muestra alteraciones del mismo en ambas líneas. Todos estos efectos, previamente descritos en otros modelos, no parecen suficientes para explicar el drástico descenso de la viabilidad celular. Por eso estudiamos el marcador de otro proceso de muerte: la autofagia. Los resultados de la expresión de la proteína LC3, son altamente significativos antes incluso de que se vean cambios en la inducción de apoptosis o en la liberación de LDH. Esta es la primera vez que se describe la existencia de autofagia en estudios de toxicidad del glifosato. En general, los resultados nos llevan a sospechar que el glifosato tiene un efecto diferencial entre ambos modelos, resultando citotóxico para las LNCap y fundamentalmente citoestático en PC3.

P-25

Efecto de un snack de manzana enriquecido con zumo de mandarina sobre los efectos hepatotóxicos del tamoxifeno

Ana Belén López Jaén¹, Pilar Codoñer Franch¹, María Miralles Molina¹, Laura Boix García¹, Noelia Betoret², Ester Betoret² y Victoria Valls Bellés¹

¹*Dpto. Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia, Valencia,*
²*Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia*

Se administró tamoxifeno a ratas Wistar durante 21 días y snacks de manzana enriquecidos con zumo de mandarina durante 28 días. La suplementación empieza una semana antes del tratamiento con tamoxifeno. Observándose que tras la administración del tamoxifeno se producía un aumento significativo ($p < 0,005$) tanto de alanina como de aspartato transaminasa. En cambio, en el grupo suplementado con el snack, tanto con/sin impregnación con zumo los niveles eran significativamente inferiores ($p < 0,005$). Con respecto a los grupos carbonilo (GC) en plasma, se observó que tras la administración de tamoxifeno se producía un incremento significativo ($p < 0,005$), sin embargo el grupo que además se suplementaba con el snack disminuía significativamente, siendo mayor en el grupo de snack impregnado. Cuando determinamos los niveles de α -tocoferol, se observó que tras la administración de tamoxifeno se producía una disminución significativa ($p < 0,005$). En los grupos que se administraba tamoxifeno y se suplementaba la dieta con el snack con/sin impregnación se observó un aumento significativo, siendo éste mayor en el grupo de snack impregnado. Con respecto a los GC y los niveles de 8OHdG hepáticos, se observó un aumento en el grupo tratado con tamoxifeno ($p < 0,005$), en cambio el grupo que además había sido suplementado con el snack se observaba una disminución significativa, siendo ésta mayor en el grupo de snack sin impregnación, en ambas determinaciones. Al determinar los niveles de α -tocoferol, se observó que el grupo tratado con tamoxifeno los niveles eran significativamente inferiores ($p < 0,005$), en cambio el grupo que además del tamoxifeno su dieta se suplementaba con el snack se observaba un aumento, siendo mayor en el grupo de snack con impregnación.

P-26

Further insights into the anticancer properties of *Annonaceus acetogenins*: Cell line selectivity and time-course differences in cytotoxicity produced by representative members of this family of natural products

Nuria De Pedro¹, Jose Rubén Tormo¹, Bastien Cautain¹, Ángeles Melguizo¹, Michel Goetz¹, Fernando Peláez², Francisca Vicente¹ y Olga Genilloud¹

¹Fundación MEDINA, Granada, ²Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid

Annonaceousacetogenins (ACG) have been described as potent inhibitors of mitochondrial Complex I and cytotoxic agents against tumor cell lines (Royo et al 2002; Tormo et al 2004). Fundación MEDINA has extended these studies by evaluating effects on six tumoral cell lines from different tissues (colon, breast, uterus, lung, liver), including one uterus multi-drug resistant cell line and two non-tumoral cell lines (breast and lung) getting a complete panel of cells culture in empiric assay treat for 24 hours with a vast variety of different ACG structures. From previous results in cytotoxicity assays, and because there have been described three binding sites for the ACG in the Complex I (Esposi et al 1994; Tormo et al 1999, 2000), a small group of the ACG was also selected for even more complete studies: *cherimolin*, that binds an acompetitive site (A), *motrilin* and *laherradurin* that bind to a non-competitive site (N o B) and *rolliniastatin-1* that bind to both simultaneously. Time course studies were performed, from 15 minutes to 48 hours, in a more sensitive LDH assay. In this communication, Fundación MEDINA uses its expertise in cancer research and natural products Drug Discovery, to determine selectivity against each cell line across treatment period where large differences are observed for the whole class as well as individual compounds particularly at short incubation times.

Índice de autores

- Alemu, Endalkachew (P-8)
 Abad Saiz, José Luis (P18-51)
 Abal Argente, Mireia (R04-5)
 Abengózar, M^a Ángeles (P15-8, P15-9)
 Abrie, Albert J. (P18-32)
 Aburto, María R. (R03-2)
 Acebes, Juan José (P12-4)
 Acebrón, Iván (P17-42, P17r-44)
 Acera, Felipe (P11-4)
 Aceves Luquero, Clara (P18-52)
 Acosta, Milena (P02-32, P-20)
 Acosta Reyes, Francisco (P17-46)
 Agnati, Luigi F. (R14r-6)
 Agra Andrieu, Noelia (P02r-34)
 Aguado Llera, David (P17-3)
 Agudo, Idoya (P-23)
 Agüera Morales, Eduardo (R16-10)
 Aguilà, Monica (P17-19)
 Aguilar, Juan (R16-8, R20-6)
 Aguilar, Rodrigo (CP5)
 Aguilar Gallardo, Cristóbal (Pe-7)
 Aguilar Piera, Juan (P21-3)
 Aguilera, Andrés (CP7)
 Aguilera, José (P18e-6, P18r-15)
 Aguilera, Laura (R20-6, P12-10)
 Aguilera, Óscar (S1.3-1)
 Aguilera Gámiz, Cristóbal (P16-2)
 Aguilera López, Andrés (P21-16)
 Aguirre Rueda, D. (P-6)
 Ahmed Mobasher, Maysa (P02-20)
 Aires Maria, José Carlos (R16-5)
 Aivar Mateo, Paloma (R20-4)
 Alaimo, Alessandro (R20-4)
 Alajarin, Ramón (P02-18)
 Alaminos Mingorance, Miguel (P-10)
 Alba, Gonzalo (P18-59)
 Albar, Juan Pablo (P12-13)
 Albasanz Herrero, José Luis (P14-5, P14-6)
 Alberdi Gonzalez, Aritz (R20-4)
 Albergaria, Catarina (P14-4)
 Albero Belda, M^a Pilar (P17-37)
 Alcalá Díaz-Mor, Martín (R06-5)
 Alcalde, Ana Isabel (P18-9, P20-4)
 Alcalde, Miguel (P17r-29)
 Alcaraz, Estefania (P18-53)
 Alcaraz Casademunt, Jordi (P-21)
 Alcázar Limones, Fermín (R01-1)
 Alcolea, P. J. (P15r-4)
 Alcolea, Pedro José (P15-10)
 Aledo Ramos, Juan Carlos (P17-21)
 Alejandro Pérez, María José (P18-49)
 Alelú Paz, Raúl (P21e-20, P21r-32)
 Alemany Lamana, Marià (R06-1, P06-4)
 Aligué, R. (P18-67)
 Aller Tresguerres, Patricio (P18-48, P01r-3)
 Almeida, Ángeles (R14-2)
 Alonso, Alicia (P05-5)
 Alonso, Ana (P15r-4, P15-10)
 Alonso, Graciela (P11r-7, P12-8)
 Alonso García, Andrés (P18-38)
 Alonso González, Carolina (P02e-7)
 Alonso Iglesias, Eulalia (P02-40, P02-41)
 Alonso Viana, Raúl (P02-8)
 Aloy, Patrick (R04-3)
 Altmann, Karl-Heiz (P17r-2)
 Álvarez, Héctor (P21e-34)
 Álvarez, Ignacio S. (P03r-2)
 Álvarez, Laura (R13-2)
 Álvarez, Luis (P02-6)
 Álvarez, Mari Carmen (P18-40)
 Álvarez, María del Carmen (R20r-7, P20r-2)
 Álvarez Castelao, Beatriz (R16-12)
 Álvarez Díaz, Silvia (S1.3-1)
 Álvarez Escolá, Carmen (R07-4)
 Álvarez García, Virginia (P02e-7)
 Álvarez Lindo, Noemí L. (R01-4)
 Álvarez Paino, Marta (P16-13)
 Álvarez Sánchez, Yanaisis Bárbara (P17-42)
 Álvarez Velilla, Raquel (P15-1, P15-3)
 Amador, Suyapa (P15r-6)
 Amara, Imen (P08-13)
 Amengual, Jaime (R06-6)
 Amengual Cladera, Emilia (P10-13)
 Amusquivar Arias, Encarnación (P07-3)
 Andraka, Nagore (P17-54)
 Andrés, Antonio (P10m-27, P10m-29, P10r-28, P18m-35)
 Andreu, David (S3.1-2, P15-8, P15-9, P17r-22)
 Andueza, Sara (P02-6)
 Anglés, Neus (P16-6)
 Angulo Cuesta, Javier (P21r-32)
 Angulo Picó, Enrique (P-5)
 Antón, M^a Milagros (P-18)
 Anton Helas, Zuriñe (P-5)

- Aragay, Anna M. (P18-65)
Aragón, C. (R05-1)
Aragón, Eric (P18-66)
Aragón, Juan J. (P10-3, P10-4)
Arahuetes, Rosa M. (P14-1)
Arana Urbietta, Lide (P18-11)
Aranda Martínez, Francisco J. (P05-6, P17-16)
Aránega, Antonia (P18-49)
Aranguren Ibáñez, Álvaro (P18-34)
Arasa Gaspar, María del Mar (P10m-21)
Arce, Altamira (P10r-15)
Archinti, Marco (P18-63)
Ardévol, Anna (R06m-4, P06-1)
Arduini, Alessandro (P03r-7)
Arechederra, María (P18-12, P19-1)
Areso, Pilar (R20-4)
Aresté, Cristina (P02m-36)
Arévalo, María Isabel (P18-61)
Arias González, J. Ricardo (R17-5)
Ariño, Joaquín (R18r-3, P12-2, P12-4, P18-18, P18-32, P18-40, P18r-33, P18r-43, P18r-44, P18r-46, P20r-3)
Arnandis, Teresa (P01r-8)
Aroca Aguilar, José Daniel (P02-10)
Arola, Anna (R06m-4)
Arola, Lluís (R06m-4)
Arolas, Joan L. (R17-1)
Arone Gaspar, Gregorio J. (P13-5)
Arqués, Oriol (P18r-41)
Arribas, Carmen (P10m-29, P10r-28, P18m-35)
Arribas Rodríguez, Gonzalo (P21-5)
Arroyo, Laura (P12-12)
Arruebo, M^a Pilar (P18-9)
Arús, Carles (P02-32, P02-33, P12-4, P-19, P-2, P-20)
Asensi Álvarez, Víctor (P02-35)
Asensio, Aaron C. (P11r-9)
Ashour Fernández, Nadia (P21e-20, P21r-32)
Asins, Guillermina (P10m-14, P10m-21, P10m-22)
Astudillo González, Aurora (P02r-12)
Atienza Manuel, Alexandra (P03r-1)
Atrian, Sílvia (P-17)
Ávila de Grado, Jesús (R14-1)
Ávila Polo, Rainiero (R01-5)
Ávila Sáez, Concepción (R13-3, P13-7)
Avilés, Francesc Xavier (R12m-3, P06-2, P08-12, P17-43, P17r-24, P17r-39, P17-27)
Avruch, Joseph (R18-1, P18-39)
Ayala, Victòria (R16-4)
Ayuda Durán, Pilar (P21r-17)
Azuaga, Ana Isabel (P17-31)
Baccarini, Manuela (R02-3)
Badia, Josefa (R16-8, R20-6, P12-10, P21-23)
Badia Careaga, Claudio (R03-4)
Baets, Jonathan (P02r-23)
Bahí, Anna (P18r-45)
Bajo, María Auxiliadora (P02-18)
Balaña Fouce, Rafael (P14-9, P15-1, P15-3)
Baldassarre, Gianluigi (P12-11)
Baldomà, Laura (R16-8, R20-6, P12-10, P21-23)
Baleriola Gómez de Pablos, Jimena (R01-4)
Ballestar, Esteban (S1.2-3)
Ballester, B. (P18-1)
Ballester Tomás, Lidia (P18r-27)
Bañales, Jesús M. (P20-5)
Bañares Hidalgo, Ángeles (P05-8)
Baptista, Antonio M. (S3.1-4)
Baptista Carreira dos Santos, Hugo Miguel (S3.3-1)
Baquero Valls, Pablo (P18r-24)
Barasoain, Isabel (P17r-2)
Barbáchano, Antonio (S1.3-1)
Barbacid, Mariano (R02-3)
Barbado, Casimiro (P20-1)
Barberà, J. Albert (P18-61, P-23)
Barceló, Anna (P12-4)
Barcelona Andrés, Belén (P17-10, P17-37, P17r-18)
Bárcena, Brenda (P10m-27, P10r-28, P10m-29, P18m-35)
Barcia, Ramiro (P17r-4)
Barcia Sanjurjo, Iria (P17r-4)
Barendregt, Arjan (P17-1)
Barneda Zahonero, Bruna (P14-3)
Baro, Barbara (P02-14)
Barquilla, Antonio (P15r-5)
Barrachina Castillo, Marta (P14-5)
Barrasa López, Juan Ignacio (P01e-2)
Barrera, C. (P18-1)
Barrero, María José (P21-30)
Barrero Díaz, Beatriz (R09-5)
Barreto, Lina (P12-2, P18-40, P18r-33, P20r-3)
Barriga, M. (P18-1)
Barrio Real, Laura (P18-30)
Barrios, Laura (P21-13)
Bart, Jean-Mathieu (R15r-3, P15r-5)
Bartrons, Ramon (R10-2, P10-17, P10-20)
Bassols, Anna (P02-26, P12-12, P16-1)
Bastos, Margarida (P15-9)
Baulida Estadella, Josep (P21-6)
Bautista, José M. (S3.2-2)
Bautista Saiz, Vanesa (P13-8)
Bayascas, José Ramón (P18-14, P18e-6)
Bayón Prieto, Yolanda (P18-38)
Beamonte, Roberto (P11-8)
Beas, Carlos (P02-27)

- Beato, Miguel (S2.3-2)
 Becerra, Manuel (P21-15)
 Becerra León, Gracia (R13r-12, P13r-2)
 Bediago, Ana (P16-15)
 Bedmar, Eulogio J. (R13-1, R13-9, P13-4, P13-5)
 Beitia San Vicente, Maider (P02-31)
 Belayachi, Lamiae (P01-9)
 Bellés Albert, José M^a (P08-9, P08-10)
 Bellí, Gemma (R16-5)
 Bellmunt Curcó, Maria Josep (P16m-10)
 Bello Gil, Daniel (P11-10, P11-5)
 Bellón, Teresa (P02-18)
 Belluardo, Natale (R14r-6)
 Benincá, C. (P18-65)
 Benítez, Javier (R02r-5)
 Benítez Roldán, Alicia (P02r-39)
 Benito Miguel, Marta (P16-13)
 Benito Mundet, Antoni (P11e-2)
 Berenguer, José (R13-2)
 Berlanga, Juan José (P21-8, P21-10)
 Bernad, Antonio (R01-4)
 Bernardo, Stella (S2.2-2)
 Bertoncini, Carlos (P17-9)
 Bertran, M. Teresa (R18-1, P18-39, P18-63)
 Betoret, Ester (P-25)
 Betoret, Noelia (P-25)
 Betti, Marco (R13-5)
 Bielanska, Joanna (P05-1)
 Bigas, Anna (S1.3-2)
 Biondi, Ricardo M. (P18r-22)
 Bladé, Cinta (R06m-4)
 Blanco, José Antonio (P17r-17)
 Blanco, Luis (R01-4, P15-10)
 Blanco Criado, Lorena (P02-31)
 Blanco Gaitán, María Dolores (R09-7, P16-13)
 Blasco, Rafael (R13r-12, P11-4)
 Blasco Moreno, Bernat (P17r-53)
 Blasco Plá, Rafael B. (R02-3, P13r-2)
 Blay, M. Teresa (R06m-4, P06-1)
 Blundell, Tom L. (CP11)
 Boada Pallàs, Jordi (P16m-10)
 Bodega Mayor, Irene (R03r-6)
 Boix, Ester (P17-14, P17r-17, P17r-22)
 Boix García, Laura (P-25)
 Bolado Carrancio, Alfonso (P10-7)
 Bolado García, Victoria Eugenia (R06-5)
 Bolaños, Juan Pedro (S2.1-1)
 Bolea, Irene (P14-7)
 Bolscher, Jan G. (P15-9)
 Boluda, Susana (P12-4)
 Bomatí Miguel, Oscar (P-20)
 Bonet, M. Luisa (R06-6)
 Bonet Piña, Luisa (R09-2)
 Bonete, María José (R13-6, P13-8, P13-10)
 Borrego, Silvia (P16-15)
 Borroto Escuela, Dasiel Oscar (R14r-6, P14-4, P17-41)
 Boscá Gomar, Lisardo (R18r-2, P16-15)
 Bosch, Fátima (R19-4, P10r-15)
 Bosch, Jaume (P21r-33)
 Boya, Patricia (P03r-8)
 Boyano, Carmen (P18-48)
 Bragado, María Julia (P-3, P-9)
 Bragado, Paloma (P18-12)
 Bravo San Pedro, José Manuel (R01-6, P01-1)
 Bréard, Jacqueline (P18-48)
 Brenner, Hans Rudolff (P10m-12)
 Bricio, Carlos (R13-2)
 Brieua, José Antonio (P02r-39)
 Briz Sánchez, Óscar (R11r-5, R16r-6, R20e-3)
 Bronsoms, Silvia (R12m-3)
 Broto, Alicia (P17-48)
 Bru, Samuel (P18-7)
 Brugnara, Laura (P-18)
 Buceta, Javier (R03-1)
 Bueno, Emilio (R13-9)
 Buey, Rubén M. (P17-15)
 Buj Gómez, Raquel (P-22)
 Bullido, María Jesús (R19r-5)
 Bustelo, Xosé R. (S1.2-1)
 Busto, María D. (P-14, P-15)
 Buxens Azcoaga, Maite (P13-3)
 Buzón, Víctor (P17e-36)
 C. Fox, Gavin (R17m-2)
 Caba, Octavio (P18-49)
 Cabañas, Miquel (P-2)
 Cabello, N. (P18-1)
 Cabello Donayre, María (P15r-7)
 Cabezas, Alicia (P17-11)
 Cabiscol, Elisa (P10r-5)
 Cabral, Sofia (R03-1)
 Cabrera, Jennifer (P02-26)
 Cacho Herrero, Judith (P07-5)
 Cadefau, Joan Aureli (P-18)
 Cadenas, Susana (R16-3)
 Caelles, Carme (R10-5, R18-1, P18r-8, P18-39, P18-61, P18-62, P18-63)
 Caimari, Antoni (R06-2)
 Cajaraville Leiro, Ana (P17-25)
 Calabria, Inés (P02-14)
 Calap Quintana, Pablo (P02r-17, P12-9)
 Calderone, Vittorio (P21r-33)
 Calero, Fernando (P20r-2)
 Calisto, Bárbara M. (P17-48)

- Calleja, Lucía (P11-8)
Caloca Roldán, María José (P18-30)
Calviño Vanegas, Eva (P01r-3, P18-48)
Calvo, Daniel (P-23)
Calvo, Enrique (P15r-5, P17r-2)
Calvo, José J. (P02-8)
Calvo, JR. (P16-4)
Calvo Álvarez, Estefanía (P15-1, P15-3)
Calvo Vidal, María Nieves (P10-20)
Calzada, Arturo (P21r-17)
Camacho Carrasco, Mónica (R13-6, P13-8)
Camacho Castillo, Luz del Carmen (P18-51)
Cameselle, José Carlos (P17-11)
Camins, Antoni (P02-27)
Campello, Laura (P02-25)
Campillo Riquelme, Laura (P02-22)
Campos Beneyto, Laura (P08-10)
Campos Ceprian, Eva (P21-23)
Campos López, J. Lourdes (P17-46)
Campos Muñoz, Antonio (P-10)
Campos Salinas, Jenny (R15r-1, P15r-7)
Campoy, Francisco Javier (P02-22)
Campuzano, Sonsoles (R03-5)
Canadell, David (P12-2, P18r-33, P20r-3)
Canalejo, Antonio (P16-12)
Canales, Ángeles (P17r-2)
Canales, José (P17-11)
Canales Carrasco, Javier (R13-3, P13-7)
Cañamero, Marta (R02-3)
Cañas, Xavier (R01-3)
Cádenas, M Luz (P03r-9)
Candiota, Ana Paula (P02-33, P12-4, P-19, P-20)
Candreva, Ángela (P06-2)
Cano, Amparo (P03-5)
Cano, Eva (P18-2)
Cano Barquilla, Pilar (R09-1)
Cánovas Ramos, Francisco (R13-3, P13-7)
Caño Delgado, Ana (P08r-18)
Cantarero, Lara (P02r-3)
Cantero, Marta (R02r-5, R19r-5, P21-11)
Caparrós Ruiz, David (R08-2)
Capellades, Montserrat (R08-2)
Capelo Martínez, José Luis (S3.3-1)
Carazo, José María (P21-13)
Carbonell, Juan (R08-1)
Cardona, María (R01-3)
Cariaga Martínez, Ariel Ernesto (P18-29, P21e-20)
Carmona, María Isabel (P11-4)
Carmona Fernández, Antonio M. (P18m-19, P18m-21)
Carnero Moya, Amancio (S1.1-1)
Caro Maldonado, Alfredo (R01-1)
Carrascal, Montserrat (R12-4)
Carrasco, María P. (P10-9)
Carrasco, Nancy (R20-1)
Carrasco Rando, Marta (P03r-1)
Carrasco Rodríguez, Patricia (P10m-6)
Carrascosa, José L. (S3.3-3, R17-5)
Carrasquer, E. (R09-8)
Carrera, Ana C. (S2.3-3)
Carriel, Víctor (P-10)
Carrión Rodríguez, Ángel M. (P14r-12)
Carvajal, Jaime J. (R19-2)
Casado, Carlos (R18r-3, P18r-33, 18r-46)
Casado Medrano, Victoria (P18-30)
Casado Pinna, Marta (P02r-34)
Casagolda, David (P18e-37)
Casals, Gregori (P12-13, P12r-7)
Casals Farré, Núria (P10m-6)
Casamayor, Antonio (P18-18, P18r-22, P18r-33, P18r-43, P18r-45, P18r-46)
Casaña, Estefanía (R19-4)
Casanelles, Elisenda (R01-7)
Casanova, Jesús C. (R03-4)
Casanova Salas, Irene (R01-7)
Casares, Fernando (R03-5)
Casas Brugulat, Josefina (P18-51)
Casas Herranz, Celia (P18-42)
Casas Rua, Vanessa (P03r-2)
Cascante, Marta (R10-4, P10-8, P-23)
Casino, Patricia (P17-38)
Cassanyé Riera, Anna (P16m-10)
Castanheira, Pedro (P08-4)
Castanho, Miguel (S3.1-2)
Castañeyra, Agustín (R14-5)
Castaño, Beatriz (R20r-5)
Castañón de la Torre, Sonia (R08-6, P-13)
Castanys, Santiago (R15r-1, P15r-2, P15r-7)
Castell Auví, Anna (R06m-4, P06-1)
Castellano Pérez, Mayte (P08-9)
Castelló, Alfredo (P21-10)
Castells, Xavier (P12-4)
Castilla Ramírez, Carolina (R01-5, P01-7)
Castillo, Virginia (P17-51, P17-52)
Castillo Acosta, Víctor (R15-2)
Castillo Montecinos, Iván (P16-5)
Castillo Rodríguez, Francisco (R13-4, P13-9)
Castillo Sarmiento, Carlos Alberto (P14-5)
Castro, Judith (P18e-17)
Castro, Marta (P18-9, P20-4)
Castro Bohórquez, Beatriz (P02e-13)
Castro Gallegos, Jessica (P11e-2)
Castro Rodríguez, Vanessa Viviana (P13-7)
Catany, Santiago (P15r-6)
Cautain, Bastien (P-26)
Caviedes Formento, Miguel Ángel (R13-8)

- Cavusoglu, Kader (P18-62)
 Ceballos Chávez, María (P21-2, P21-5)
 Cebrián Pérez, José Álvaro (P01-5, P11-8)
 Ceccacci, Florencia (P08-12)
 Cedó, Lúdia (R06m-4, P06-1)
 Celaya, Garbiñe (P17r-23)
 Centelles, Josep J. (P10-8)
 Cepeda, Silvia (P16-3)
 Cerdá, Concha (P16-15)
 Cerdán Villanueva, María Esperanza (P21-12, P21-15)
 Ceresi, Enzo (R06-6)
 Cerezo Guisado, María Isabel (P-12)
 Cerrada, Alejandro (R05r-3)
 Cervera, Javier (P02-37, P17-38)
 Cervera Miralles, Javier (P17-10, P17r-18, P17-37)
 Chamizo Ampudia, Alejandro (P13r-1)
 Chamorro, Margarita (P10e-2)
 Champeil, Philippe (R05r-5)
 Chardonnnet, Solenne (R05r-5)
 Cheetman, Michael E. (P17-19)
 Chiappi, Michele (S3.3-3)
 Chichón, Francisco Javier (S3.3-3)
 Chiloeches Gálvez, Antonio (P18r-24)
 Choder, Mordechai (R12r-2)
 Christodoulou, John (P17-9)
 Chueca Sancho, Ana (P08-6)
 Ciaurriz, Paula (P11r-9)
 Cidre, Florencia (P18-2)
 Cinca, J. (P18-1)
 Ciordia, Sergio (P12-13)
 Ciruela, Francisco (R14r-6, P14-4, P14-11, P18r-3)
 Cisneros, Falgàs (P11-14)
 Cisneros, Sebastián (P08-12)
 Cisneros Barroso, M.E. (P18-67)
 Citores González, Lucía (P08-2, P17-5)
 Claro, Enrique (P18r-15)
 Clavería Izquierdo, Cristina (R03-3)
 Clayton, Jamie (P07-3)
 Clotet, Josep (P18-7)
 Coca Prados, Miguel (P02-10)
 Codina, Montserrat (P18e-37)
 Codina Grau, M^a Gema (P04-1, R04-5)
 Codina Pascual, Montserrat (P18r-8)
 Codoñer Franch, Pilar (P02-40, P02-41, P-25)
 Cohen, Philip (CP1)
 Colás Escudero, Begoña (P21e-20)
 Colell, Anna (R18-5)
 Collantes Bellido, Elena (P-12)
 Coloma, Antonio (P02r-23)
 Colombo, María Laura (P08-12)
 Comella, Joan (R01-3)
 Comes, Núria (R05-7)
 Conde, Núria (CP6)
 Condes Hervas, Mónica (P14-6)
 Condom, Enric (P05-1)
 Conejero Lara, Francisco (P17-31)
 Conejero Tomás, Vicente (P08-9, P08-10)
 Conesa, Ana (S3.2-1)
 Contestabile, Roberto (P17r-26)
 Cook, Stuart (R01-3)
 Coombs, Graham H. (R15-5)
 Corbalán García, Senena (R05-4)
 Córcoles Sáez, Isaac (P18r-27)
 Cordero, Alex (P11-14)
 Córdoba García, Francisco (P16-12)
 Cordomi, Arnau (P17-19)
 Cordón Barris, Lluís (P18-14)
 Cornejo Zamorano, Pamela (P16-5, P16-8)
 Correa, David (R13-1)
 Cortés, M. Alicia (P18-29)
 Cortés, Roldán (P-23)
 Corthals, Garry (S3.3-1)
 Cos, Samuel (P02e-7)
 Cossarizza, Andrea (P16-14)
 Costas, María Jesús (P17-11)
 Couso Liañez, Inmaculada (P08-3)
 Cozar Castellano, Irene (P-4)
 Crespo, Ainara (P02r-12, P-13)
 Crespo, José Luis (P08-3, P08-5)
 Cruces, Jesús (P02-25, P02r-23)
 Cruz Izquierdo, Álvaro (P-5, P-11)
 Cuadros, Thais (P18-54)
 Cuenca, Nicolás (P02-25)
 Cuenca Bono, Bernardo (P21-7)
 Cuenda Méndez, Ana (P-12)
 Cuezva, José M. (P10e-2)
 Cull, Benjamín (R15-5)
 Cussó, Roser (P-18)
 D. Baxter, John (P17e-36)
 D'Altri, Teresa (S1.3-2)
 Da Poian, Andrea T. (S3.1-2)
 Daher, W. (R15-4)
 Daly, Amanda C. (P02e-38)
 Damas, João M. (S3.1-4)
 Dasí, Francisco (P16-15)
 Daura, Xavier (R12-1, P12-6)
 Dave, Natalia (P18e-37, P21-3)
 Davière, Jean-Michel (S2.2-2)
 Dávila Huerta, Myriam (P-19)
 De, Saurav (S1.1m-3)
 De Atauri, Pedro (P10-8)
 De Blas, Elena (P01r-3, P18-48)
 De Bolós, Carme (P02m-42)

- De Haro, César (P21-8, P21-10)
De la Cruz Díaz, Jesús (P17-13)
De la Fuente, Jesús Ángel (P17e-45)
De la Rosa, Enrique (R01-4, P03r-8)
De la Rosa Acosta, Miguel Ángel (P01-6)
De la Torre, Beatriz G. (P15-8)
De la Torre Ruiz, M^a Ángeles (P18r-27)
De la Torre Tejedor, Encarnación (P04-1)
De la Villa, Pedro (R02r-5)
De las Heras, Beatriz (P18-2)
De las Rivas, Blanca (P17-42, P17r-44)
De Llorens, Rafael (P02m-42)
De los Ríos, Cristóbal (P14-7)
De Luca, Daniel (R07r-5)
De Lucas, Miguel (S2.2-2)
De Luis, Oscar (P02r-23)
De Miguel, Nuria (P-20)
De Montaigne, Amaury (P13-6)
De Munck, Estefanía (P14-1)
De Nadal, Eulàlia (CP6, P21r-27)
De Pedro, Nuria (P-26)
De Pereda, José M. (P17-15)
De Pourcq, Karel (P11-14)
De Sousa Coelho, Ana Luísa (P10-24, P10m-26)
De Toro Martín, Juan (R07-4)
De Torres, Inés (P18-54)
De Vera, Nuria (P14-9)
De Vries, Sacco (P08r-18)
De Waal, Bas (P11-11)
Del Castillo, Urko (P17r-23)
Del Peso, Luis (P21-14)
Del Pino García, Javier (P21-10)
Del Pozo Martín, Yaiza (P14r-12)
Del Reino Fernández, Paloma (P-12)
Del Valle Pérez, Beatriz (P18r-8, P18e-37, P18r-41)
Delgado, Juan Ramón (P18-49)
Delgado, Marco Antonio (P16m-10)
Delgado, María Jesús (P13-4, R13-9)
Delgado, Mario (R15r-1, P15r-6)
Delgado Cirilo, Antonio (P18-51)
Delgado Esteban, María (R14-2)
Delgado Goñi, Teresa (P02-32, P-2, P-20)
Delgado Mederos, Raquel (P02-33)
Delicado, E.G. (R05-1)
Dentesano, Guido (P21-24)
DeSalle, Rob (P-8)
Devesa, Fernando (P21r-17)
Dewitte, Walter (P08-7)
Di Croce, Luciano (S1.3-3, P21-3)
Diago Navarro, Elizabeth (P17-1)
Díaz, José Fernando (P17r-2)
Díaz, Pedro (R13-5)
Díaz, Rosario (P15r-5)
Díaz Moreno, Antonia (P16-2)
Díaz Moreno, Irene (P01-6)
Díaz Orejas, Ramón (P17-1)
Díaz Quintana, Antonio (P01-6)
Díaz Rúa, Rubén (R06-2)
Díaz Sánchez, Sara (P14-5)
Díaz Troya, Sandra (P08-5)
Diez, Amalia (S3.2-2)
Diez, José Carlos (R16-9, P01-4)
Diez Fernández, Carmen (P17r-18)
Disalvo, Anibal (R05-6)
Dobson, Christopher (P17-9)
Docampo, María José (P02-26)
Docampo, Roberto (P02r-4)
Docena, Guillermo (P06-2)
Doello González, Kevin (P-10)
Domenech, Rosa María (P17-3)
Domingo, Juan (P01-5)
Domingo, Santiago (Pe-7)
Dopazo, Hernan (P21-7)
Dos Reis, Suzana (P17r-20)
Drzyzga, Oliver (P12-11)
Dubus, Pierre (R02-3)
Dufour Rausell, David (P17-10)
Duñach, Mireia (P18r-8, P18e-37, P18r-41)
Durá, Lara María (P18e-17)
Duran, Jordi (P-8)
Egea Jiménez, Antonio Luis (R05-4)
Eguzkizaga Zamarripa, Eneko (P02-31)
Ejarque Ortiz, Aroa (P21-24)
El Mjjiyad, Nadia (R01-1)
Elias, Ivet (P10r-15)
Elkhalfi, Bouchra (P08m-8)
Encina, Antonio (R08-2)
Enguix, Natalia (R02m-4, P02-2)
Erazo, Tatiana (P18e-6, P18r-15)
Errarte Yarza, Peio (P02-31)
Esclapez Espliego, Julia M^a (P13-8)
Escobar, Javier (P03r-7)
Escobedo, Albert (P18-66)
Escribano Martínez, Julio (P02-10)
Escrig, Raquel (P03r-7)
Escrivá Pons, Fernando (R07-4)
Escudero, Beatriz (R01-4)
Escudero, Norberto (R13-11)
Eslami, Gilda (P17-49)
Espada, Lilia (P18-57)
España, Judit (P14-3)
Espargaró Colomé, Alba (P17-51)
Espinár Marchena, Francisco José (P17-13)
Espinell González, Alberto (P16m-10)

- Espinosa, Lluís (S1.3-2)
 Espinosa Angarica, Vladimir (P12-3)
 Esquifino Parras, Ana Isabel (R09-7)
 Estañ Omaña, Cristina (P01r-3, P18-48)
 Esteba Martín, Santiago (P17-9)
 Esteban, Mariano (S3.3-3)
 Esteban Torres, María M. (P17-42)
 Estebáñez Perpiñá, Eva (P17e-36)
 Esteller, Manel (P21-2)
 Estomba, Haizea (P03r-9)
 Estrada, Pilar (P05-8)
 Etxeberria, Ainhoa (R20-4)
- Fàbregas Vallvé, Norma (P08r-18)
 Fabriàs Domingo, Gemma (P18-51)
 Fadó, Rut (P14-3)
 Falqués, Anton (P18-53)
 Fano, Oihane (P02r-23)
 Faro, Carlos (P08-4)
 Faro, Rosario (P08-4)
 Farran, Andreu (P-18)
 Farrés, Jaume (P17e-45, P17r-47)
 Felipe, Antonio (R05-7, P05-1)
 Feliu, Juan E. (P02-2)
 Fenwick, Bryn (P17-9)
 Fernández, Alejandro (P10r-28, P10m-29, P15r-4)
 Fernández, Almudena (R02r-5, R19r-5)
 Fernández, Ana M. (S2.1-2)
 Fernández, Ascensión (P17-11)
 Fernández, Cristina (P17-6)
 Fernández, Darío (P02r-16, P18-55)
 Fernández, Mercedes (P21r-33)
 Fernández, Ricardo (R16-10)
 Fernández Álvarez, Ana (P02r-34)
 Fernández Arancibia, Virginia (R16-11)
 Fernández Briera, Almudena (P12-5)
 Fernández Briones, Alejandro (P10m-27, P18m-35)
 Fernandez Busquets, Xavier (P17r-33)
 Fernández Capetillo, Óscar (R07-1)
 Fernández Chacón, R. (R14-3)
 Fernández Cid, Alejandra (P18r-20)
 Fernández de las Heras, Laura (P12-11)
 Fernández de Mattos, Silvia (P01-9, P02-28, P18-52, P18-56)
 Fernández Dueñas, Víctor (P14-4, P14-11)
 Fernández Fernández, Laura (P16-6)
 Fernández García, Paula (P18r-25)
 Fernández Higuero, José Ángel (P17r-23, P17-28)
 Fernández Larrea, Juan (R06m-4)
 Fernandez Lizarbe, Sara (P02-29)
 Fernández López, José Antonio (P06-4)
- Fernández Millán, Elisa (R07-4)
 Fernández Miñán, Ana (P21-13, P21-14)
 Fernández Navarro, Ana (P02-10)
 Fernández Novell, Josep M. (R09-6)
 Fernandez Orgiler, Abel (P15-10)
 Fernández Orth, Juncal (R20-4)
 Fernández Pevida, Antonio (P17-13)
 Fernández Prada, Christopher (P15-1, P15-3)
 Fernández Recio, Juan (P17e-36)
 Fernández Reyes, Emilio (R13-10, P11r-6, P13r-1, P13-6)
 Fernández Reyes, María (P15-8, P15-9)
 Fernández Rivero, Noelia (P17r-34)
 Fernández Rubio, Celia (P15-1)
 Fernández Salguero, Pedro M. (S1.2-3)
 Fernández Sánchez, Laura (P02-25)
 Fernández Tresguerres, Elena (P17-6)
 Fernández Varo, Guillermo (P12r-7)
 Fernández Vega, Iván (P02r-12, P-13)
 Fernández Veledo, Sonia (R10m-3, P02m-19, P18m-31)
 Ferré, Sergio (P18r-3)
 Ferre, Tura (P10r-15)
 Ferreira, Elaine (R16-8)
 Ferreira, Laura (P02-8)
 Ferrer, Gemma (S1.3-1)
 Ferrer, Maria Luisa (R11-4)
 Ferrer Abizanda, Isidre (P14-5)
 Ferrer Dalmau, Jofre (P18-18, P18r-43)
 Ferrer Navarro, Mario (P06-2, P12-6, R12-1)
 Ferrer Vicens, Ivan (P01r-8, P10r-10)
 Ferreras Rodríguez, José Miguel (P08-2, P17-5)
 Ferreres, Joan Carles (P05-1)
 Field, Jessica J. (P17r-2)
 Fillet, Sandy (S2.1-2)
 Fita, Ignasi (P17-32, P17-48)
 Floran, Benjamin (P18r-3)
 Florencio, Francisco J. (P05-3, P08-5)
 Flores, Ana Isabel (R05r-3)
 Flores, Carmen Lisset (P10-16)
 Flores de Mera, M. Luz (R01-5, P01-7)
 Florio, Rita (P17r-26)
 Folch, Jaume (P02-27)
 Fonfría Subirós, Elsa (P17-46)
 Font, Isaura (P21-29)
 Fontanil López, Tania (P02-35)
 Fontela, Tomás (P18-55)
 Formentini, Laura (P10e-2)
 Fornalé, Silvia (R08-2)
 Forns, Xavier (P12r-7)
 Foroutan, Arash (P14-8)
 Foster, Steven S. (S1.1m-3)
 Frago, Susana (P17r-7)

- Fraile, Lorenzo (P16-1)
 Franch de Armas, Orisley (P17-41)
 Franckhauser, Sylvie (P10r-15)
 Franco, Rafael (P18r-3)
 Francoz, Sarah (R02-3)
 Freire, João Miguel (S3.1-2)
 Freitas, A. (P18-65)
 Frenal, K. (R15-4)
 Fresquet Arnau, Vicente (P17-10)
 Frias, M^a Angeles (R05-6)
 Fricker, L.D. (R12m-3)
 Fuentes, José Manuel (R01-6, P01-1)
 Fuentes Blanco, Francisco (R04-5)
 Fuerst, Oliver (S3.1-3)
 Fuertes Álvarez, Sandra (P21r-26)
 Fuguet, Elisabet (P06-5)
 Furukawa, Kentaro (CP6)
 Fuxe, Kjell (R14r-6, P14-4, P17-41)
- G. Miguel, Begoña (P14-1)
 G. Palmer, Héctor (S1.1m-2)
 G. Pichel, José (P19-2)
 G. Pitalúa, Julia (P18-10)
 G. Taneva, Stefka (P17r-23)
 Gacias Monserrat, M^a del Mar (P10-25, P10m-30)
 Galán Bartual, Sergio (R17m-2)
 Galeano, Núria (P18-53)
 Galgoczy, Roland (P-21)
 Gallardo, Nilda (P10m-27, P10r-28, P10m-29, P18m-35)
 Gallastegui, Edurne (P21-21)
 Galleano Bonivardo, Mónica (R16-11)
 Gallego Giraldo, Carolina (R08-1)
 Gallego Pinos, Javier (P21r-33)
 Galván Cejudo, Aurora (R13-10, P11r-6, P13r-1, P13-6)
 Galvis Serrano, Fabián (P11-1)
 Gamarro, Francisco (R15r-1, P15r-2, P15r-6, P15r-7)
 Gambino, Yésica (P18m-19, P18m-21)
 Gamero Negrón, Rafael (P01-1, R01-6)
 Gañán Gómez, Irene (R16-9, P01-4)
 Gancedo, Carlos (P10-16)
 Gandía, Jorge (P14-4, P14-11)
 Gangoiti, Joana (R11-3, P11r-12)
 Gangoiti, Patricia (P18-11)
 Gangoiti Muñecas, Joana (P-11)
 García, Belén (P02r-23)
 García, Concha (P01r-8, P10r-10)
 García, Jesús (R19-4)
 García, Marta (P02r-12)
 Garcia, Miquel (R19-4, P10r-15)
- García, Olivia (P02r-12)
 García, Pedro (P11-11)
 García, Santiago (P20-4)
 García Alonso, Sara (P21r-26)
 García Arumí, Elena (R01-3)
 García Belinchón, Mercè (R01-7)
 García Bermúdez, Javier (P10e-2)
 García Blázquez, Alba María (R11r-5)
 García Borrón, José Carlos (P18-64)
 García Caballero, Melissa (P02-11)
 García Calderón, Margarita (R13-5)
 García Cánovas, Francisco (P10-18, P10-19)
 García Carmona, Francisco (R11-6, P11-3, P11-13)
 García Carrillo, Scheherezade (P17-16)
 García Cubillas, Miriam (P18e-4)
 García de Frutos, Pablo (P02m-36)
 García de Herreros, Antonio (P18r-8, P18e-37, P18r-41, P21-3)
 García de la Cruz Valencia, Rocio (Pr-16)
 García Díaz, Ángel (P08-6)
 García Diz, Luis (R06-8)
 García Dorado, David (R01-3)
 García Doval, Carmela (R17m-2)
 García España, Antonio (P-8)
 García Fernández, Jordi (R03-5)
 García García, María Inmaculada (R11-6, P11-3, P11-13)
 García García, Tránsito (R20r-7)
 García González, Miguel (P10-9)
 García Guerra, Lucía (R10m-3, P18m-31)
 García Hegardt, Fausto (P10m-6, P10m-14, P10m-21, P10m-22)
 García Hernández, Raquel (R15r-1, P15r-2, P15r-7)
 García Hernández, Violeta (P02-8)
 García Hevia, Lorena (P12-1)
 García López, José Luis (R13-4)
 García Lucerga, C. (P-6)
 García Madrid, Albert (P18-54)
 García Marín, José Juan (R07r-5, R11r-5, R16r-6, R20e-3, R20r-5)
 García Marín, Luis Jesús (P-3, P-9)
 García Molina, Francisco (P10-18, P10-19)
 García Molina, María (P10-18, P10-19)
 García Molinero, Varinia (P21-7)
 García Moreno, H. (P16-4)
 García Muñoz, Patricia (P21e-34)
 García Oliver, Encar (P21-9)
 García Palmer, Francisco José (R09-4)
 García Pardo, Javier (P17-43)
 García Pérez, Ana Isabel (R16-9)
 García Pras, Esther (P21r-33)

- García Prat, Laura (P18-26)
 García Ruiz, Eva (P17r-29)
 García Ruiz, Juan Manuel (P17-49, P18-50)
 García Ruiz, Pedro Antonio (P10-19)
 García Salguero, Leticia (R06r-7)
 García Suárez, Olivia (P-13)
 García Tardón, Noemí (P14r-2, R14r-7)
 García Trevijano, Elena R. (P01r-8, P10r-10)
 García Vallvé, Santiago (R06m-4, P10-23)
 García Vilas García, Javier Alejandro (P02r-21)
 Garciandia Sesma, Ane (P03r-6)
 Garrido Martínez, María (P18-51)
 Garrido Mesa, José (P21-28)
 Garriga, Pere (P17-19)
 Garriga Solé, Pere (P17-40, P17-41)
 Garzón, Ingrid (P-10)
 Gascón, Félix (R16-10)
 Gasset Rosa, Fátima (P17-6)
 Gavira Gallardo, José Antonio (P18-50)
 Gegg, Matt (R01-6)
 Gelb, Michael H. (R15-2)
 Gelis, Samuel (P20-1)
 Gella, Alejandro (P14-7)
 Gelpí, Josep Lluís (P10-8)
 Gemeiner, Manfred (P12-12)
 Genilloud, Olga (P-26)
 Gennis, Robert (R13-2)
 Gevaert, Kris (R12m-3)
 Gianotti, Magdalena (P10-13)
 Gibellini, Lara (P16-14)
 Gibert, Isidre (R12-1, P12-6)
 Gil, Anabel (P18-60)
 Gil, I. (R09-8)
 Gil, José A. (P11r-7, P12-8)
 Gil, María Cruz (P-3, P-9)
 Gil Araujo, Beatriz (P18-10)
 Gil Guiñón, Estel (R01-7)
 Gil Martín, Emilio (P12-5)
 Gil Quintana, Erena (R13-7)
 Gilabert Juan, Javier (P02r-15)
 Giménez, Cecilio (R14r-7)
 Giménez, Joan (P17e-45)
 Giménez, Rosa (R16-8, R20-6, P12-10)
 Giménez Bonafé, Pepita (P10-20)
 Giménez Hidalgo, Alicia (P-21)
 Giménez Martín, Cecilio (P14r-2)
 Giménez Zaragoza, D. (P18-67)
 Ginel, A. (P18-1)
 Giovinazzo, Giovanna (R03-3)
 Giráldez, Servando (P18-13, P18-28)
 Giraldo, Jesús (P12-2)
 Giraldo, Rafael (P17-6)
 Girón González, María Dolores (P21-28)
 Glavina, Juliana (R04-4)
 Goday, Adela (P08-13)
 Godoy, Valeria (P20-5)
 Goerner, Nina (P18-66)
 Goethals, Marc (R16-12)
 Goetz, Michel (P-26)
 Gómez, Carmen (R19r-5)
 Gómez, Federico P. (P-23)
 Gómez, María Dolores (R08-1)
 Gómez, Néstor (P18e-6)
 Gómez Fernández, Juan Carmelo (R05-4)
 Gómez Foix, Anna Mª (P18-36)
 Gómez Hierro, A. (P18-67)
 Gómez Maldonado, Laura (P21-14)
 Gómez Muñoz, Antonio (P18-11)
 Gómez Posada, Juan Camilo (R20-4)
 Gómez Sánchez, José Carlos (R14-2)
 Gómez Sánchez, L. (R14-3)
 Gómez Sánchez, Rubén (P01-1, R01-6)
 Gómez Skarmeta, José Luis (S1.2-3, R03-5, P21-13, P21-14)
 Gómez Soler, Maricel (P14-4)
 Gómez Trias, Néstor (P18r-15)
 Gomis, Ramón (P18-61)
 Gomis Pérez, Carolina (R20-4)
 Gomis Rùth, F. Xavier (R17-1)
 Gomollón, Fernando (P20-4)
 Goñi, Félix (P05-5)
 González, Alicia (P02e-7)
 González, Asier (R18r-3, P18-32, P18r-33, P18-40, P18r-43, P18r-46)
 González Ballester, David (P11r-6)
 González Castaño, José (R16-12)
 González Corpas, Ana (P21e-20, P21r-32)
 González García, Ana Cristina (P15-12)
 González García, Esther María (R13-7)
 González Gómez, Mª Julia (P18-23)
 González González, Sergio (P18r-3)
 González Manchón, Consuelo (P02-5, P02r-16, P19-1)
 González Milicua, José Carlos (P17-28)
 González Muñoz, Rosario (P14-11)
 González Neira, Anna (R02r-5)
 González Pacanowska, Dolores (R15-2, P15-11, P21-18)
 González Pérez, David (P17r-29)
 González Pérez, Esther (R03-5)
 González Polo, Rosa Ana (P01-1, R01-6)
 González Rey, Elena (R15r-1, P15r-6)
 González Reyes, Acaimo (S2.2-1)
 González Rico, Francisco J. (S1.2-3)
 González Rico, Francisco Manuel (P17-49)

- González Rodríguez, Águeda (P02-20)
González San Martín, Francisco (R20r-5)
González Sánchez, Ester (R16r-6, R20e-3)
González Sánchez, Zaira (R13-10)
González Sancho, José Manuel (S1.3-1)
González Sarmiento, Rogelio (P18-30)
González Siso, Isabel (P21-15)
González Través, Paqui (R18r-2)
González Yanes, Carmen (P18m-19)
Gonzalo, Sergio (P18-9)
Gonzalo Benito, Hugo (P16m-10)
Goormaghtigh, Erik (P17-12)
Gordo Gilart, Raquel (P02-6)
Gormaz, María (P03r-7)
Gosens, Karien (P03r-7)
Goulas, Theodoros (R17-1)
Goya, Luis (P02-20)
Gozalbo Rovira, Roberto (P02-37, P17-10, P17-38)
Gracia, N. (R09-8)
Graña Montes, Ricardo (P17-52)
Granados, Carla (P17r-39)
Granados, Nuria (R06-6)
Grañé-Boladeras, N. (R20e-2)
Granell, Meritxell (S3.1-3)
Granell Albert, Pablo (P08-9)
Grasa, Laura (P18-9, P20-4)
Gresa Arribas, Nuria (P21-24)
Gris, Albert (P02-26)
Gros, Belén (P20-4)
Grosdidier, Solène (P17e-36)
Guaman, Ana (P-23)
Guerrero, Carmen (P18-12, P19-1)
Guerrero, Isabel (S2.2-1)
Guerrero, Mario (P-18)
Guerrero Sirera, Consuelo (P02-29)
Guijo, María Isabel (P11-4)
Guijo Molero, Macarena (P21-2)
Guillem Llobat, Paloma (P21-4)
Guillén, Natalia (P11-8)
Guinovart, Joan J. (R09-6)
Guirola, María (P-17)
Gumà, Anna (P07-2, P10m-12)
Gupta, Dharmendra (R08-3)
Gustafsson, Jan-Ake (P16m-7)
Gutiérrez, Ricardo (P21-3)
Gutiérrez Berzal, Javier (P19-1)
Gutiérrez Herrero, Sara (P19-1)
Gutiérrez Martín, Yolanda (R05r-5)
Gutiérrez Uzquiza, Álvaro (P18-12)
Guttmann, Peter (S3.3-3)
Guzmán López, Karla (P21-23)
Gygi, Stephen P (P18-63)
Hall, Michael N. (CP4, P15r-5)
Haller, Thomas (R05r-3)
Hamel, Ernest (P17r-2)
Haro, Diego (P10m-26)
Haro Bautista, Diego (P10-24, P10-25, P10m-30)
Haro García, María (P07-5)
Heck, Albert JR (P17-1)
Henao, Fernando (R05r-5)
Hermida, Carmen (P10-3, P10-4)
Hernández, Agustín (P05-4)
Hernández, Ligia Verónica (P18-9)
Hernández, Sara (P18-7)
Hernández Álvarez, María Isabel (P10m-11)
Hernández Arriaga, Ana María (P17-1)
Hernández Garrido, Marita (P18e-4)
Hernández Hernández, Ángel (P16r-11)
Hernández Losa, Javier (P05-1)
Hernández Rocamora, Víctor Manuel (P11-11)
Hernández Ruiz, Laura (P02r-4, P02-9, P02r-39)
Hernández Vega, Amayra (R03-1)
Hernando, Henar (S1.2-3)
Herráez, Ángel (P01-4)
Herráez Aguilar, Elisa (R07r-5, R11r-5, R20e-3)
Herráez Sánchez, Ángel (R09-5)
Herraiz, Cecilia (P18-64)
Herranz, Nicolás (P21-3)
Herranz, Sandra (P18-2)
Herrera, Guadalupe (P16-14)
Herrera, Rito (P12-2, P20r-3)
Herrera Castellón, Emilio (R07-2, P07-3, P07-6, P07e-7)
Herrera Martín, Guadalupe (P02-41)
Herrero, Enrique (R16-5)
Herrero, Laura (P10m-14, P10m-21, P10m-22)
Herrero, Pilar (P18r-20)
Herrero Espílez, Pilar (P18r-25)
Herrero Perpiñan, Enrique (P18-42)
Herrero Ruiz, Joaquín (P18-13, P18-28)
Hervás, Manuel (R05-2, P01-6, P05-3)
Hidalgo, Juan (Pe-7)
Hierro, Loreto (P02-6)
Higuera Sobrino, José Javier (R13-10)
Hijazi Vega, Maruan (R07r-6)
Hill, Caroline S. (P02e-38)
Hohmann, Stefan (CP6)
Hormeño, Silvia (R17-5)
Hortelano, Sonsoles (P18-2)
Hortigón Vinagre, María Pura (R05r-5)
Hourcade Bueno, Juan de Dios (R19-3)
Hove Madsen, L. (P18-1)
Huedo, Pol (R12-1, P12-6)
Hurtado de Llera, Ana (P-3, P-9)

- Ibáñez, Ignacio (R14r-7, P14r-2)
 Ibáñez García, M^a Isabel (R13-4)
 Ibaguren, Maitane (P05-5)
 Ibarra, Borja (R17-5)
 Igeño González, María Isabel (P13r-2, R13r-12)
 Iglesias Álvarez, Rosario (P08-2, P17-5)
 Iglesias Diz, David (P12-5)
 Iglesias Gómez, José (P18-49)
 Iglesias Guimaraes, Victoria (R01-7)
 Imperial, Santiago (P11-14)
 Íñiguez Peña, Miguel Ángel (P21-4, P21-25)
 Irazusta, Jon (P03r-9)
 Irigoyen, Antonio (P18-49)
 Irímia, Manuel (R03-5)
 Itarte, Emilio (P18-34, P18-53, P18-54)
 Izaurrealde, Elisa (CP3)
 Izpisúa Belmonte, Juan Carlos (P21-30)
 Izquierdo, Adriana (P02r-23, P02-25)
 Izquierdo, José M. (P21-19, P21-22)
- J. Cabré, Elisa (P17-12)
 Jacas Mateu, Jordi (P10m-6)
 Jacobson, Kenneth A. (P14-4)
 Janda, Lubomir (Pr-16)
 Japón Rodríguez, Miguel A. (R01-5P01-7, P18-13, P18-28)
 Jara, Mònica (R01-7)
 Jara, Paloma (P02-6)
 Jenó, Paul (P08-5)
 Jerónimo, Celia (P21-3)
 Jiménez, E. (R05-1)
 Jiménez, Felipe (R20r-5)
 Jiménez, José Luis (P21-10)
 Jiménez, Juan (P18-59)
 Jiménez, Natalia (P21-13)
 Jiménez, Silvia (R20r-5)
 Jiménez, Verónica (R19-4)
 Jiménez, Wladimiro (P12r-7, P12-13)
 Jiménez Alonso, María Isabel (P15-3)
 Jiménez Barbero, Jesús (P17r-2)
 Jiménez Cervantes, Celia (P18-64)
 Jiménez Chillarón, Josep C. (R07-3)
 Jiménez García, Sofía (P11-3)
 Jiménez López, José M. (P10-9)
 Jiménez Martí, Elena (P-17)
 Jiménez Menéndez, Nereida (R17-6)
 Jiménez Monreal, Antonia M. (R06-8)
 Jiménez Mora, Eva (P18r-24)
 Jiménez Núñez, María Dolores (P02r-39)
 Jiménez Xarrié, Elena (P02-33)
 Johansen, Terje (P-8)
 Jordan, Albert (P10-17, P21-21, P21-29)
- Jordan, Ibert (P21-30)
 Jordán Pla, Antonio (P21r-31)
 Jorriñ, Jesús (P20-1)
 Jové, Mariona (R16-4)
 Juárez, Silvia (P12-13)
 Julià Sapé, Margarida (P12-4)
 Junyent, Félix (P02-27)
 Jurado Oller, José Luis (P11r-6)
 Jurado Pueyo, María (R10m-3)
- Kahn, Richard (R17m-2)
 Kaminski, Clemens (P17-9)
 Kanakkanthara, Arun (P17r-2)
 Kjellén, Jimmy (CP6)
 Kouvonen, Petri (S3.3-1)
 Kowalczyk, Wioleta (S3.1-2)
 Kraft, Claudine (P21r-27)
 Kralli, Anastasia (R02m-4, P02-2)
 Krell, Tino (S2.1-2, P13-4, P18-50)
 Kumar, Amit (S2.3-3)
 Kumar, T. Santhosh (P14-4)
- Laborda, Jorge (R10-2, P18-23)
 Laboreo Antorán, Magali (R04-5)
 Lacal, Jesús (P18-50)
 Lacasa, Cristina (P18-63)
 Ladelfa, María Fátima (R04-4)
 Lafuente Barquero, Juan Fco. (P21-16)
 Lafuente Pérez, Alejandro (R13-8)
 Lagares Tena, Laura (R01-1)
 Lamark, Trond (P-8)
 Langhi, Cédric (P18-16, P18r-47)
 Lanuza Masdeu, Jordi (P18-61)
 Larraga, Vicente (P15r-4, P15-10)
 Larriba, María Jesús (S1.3-1)
 Lasa, Marina (P18-10)
 Lasheras, Jaime (P02-2)
 Latorre, Eva (P18-9, P20-4)
 Lázaro, Antonio (P10-3, P10-4)
 Lazarova, Tzvetana (P14-8)
 Lazo, Pedro A. (P02r-3, P17r-4, P18r-5, P21-1)
 Leal Rojas, Pamela (P21e-34)
 Leblanc, Gérard (S3.1-3)
 Legnaioli, Tommaso (P08-17)
 Lehmann, Heike (R19-1)
 León, Gonzalo (P18e-17)
 León, Pilar (P05-3)
 León Guerrero, David (R15r-1)
 Letelier Arias, Pablo (P21e-34)
 Leung, Jeffrey (P08-17)
 Lezamiz Herrero, Ainhoa (P-11)

- Li, Na (P08r-18)
Liesa, Marc (P10m-11)
Limón Mortés, M. Cristina (P18-13, P18-28)
Limonos Cornejo, María (P07e-7)
Lin, Yibin (S3.1-3)
Linares Clemente, P. (R14-3)
Linares Gil, Ana (P18-49)
Lisón Párraga, Purificación (P08-9, P08-10)
Lizarbe Iracheta, María Antonia (P01e-2)
Lizarraga, M^a Antonia (P-18)
Lizarraga Mollinedo, Esther (R07-4)
Lizcano, José Miguel (P18e-6, P18r-15)
Llach, A. (P18-1)
Lladó, Isabel (P10-13)
Llama, María Jesús (R11-3, P-5, P-11, P11r-12, P13-3)
Llamas Azua, Ángel (P13r-1)
Llamas Saiz, Antonio (R17m-2)
Llanillo, Marcial (P16r-11)
Llopis, Ana (P21-7, P21-9)
Llorens, José Vicente (P02r-17, P12-9)
Llorente Izquierdo, Cristina (P02r-34)
Luis, Carme (P18r-3)
Lomas, Rodrigo (S3.2-1)
Lope Piedrafita, Silvia (P02-32, P02-33, P-20)
López, David (P05-5)
López, José Antonio (P17r-2)
López, Virginia (P10m-27, P10r-28, P10m-29)
López Aparicio, Pilar (Pr-24)
López Arolas, Joan (P17-43)
López Begines, Santiago (R19-6)
López Bigas, Nuria (R12-5)
López Corcuera, B. (R05-1)
López de Munain, Adolfo (P01-1)
López de Vergara, Oihana (P16-3)
López Estévez, Susana (P17-25)
López Fanarraga, Mónica (P12-1)
López Farfán, Diana (R15r-3)
López García, Icíar P. (P19-2)
López Gómez, Virginia (P18m-35)
López Gresa, M^a Pilar (P08-9, P08-10)
López Guerrero, Aida M^a (P03r-2)
López Jaén, Ana Belén (P-25)
López Maury, Luis (P05-3)
López Méndez, Patricio (P21e-34)
López Paz, Cristina (R08-5)
López Rodríguez, Elena (P17-12)
López Rodríguez, Laura Catalina (P17r-20)
López Ruano, Guillermo (P16r-11)
López Ruiz, Pilar (P18-29, P21e-20)
López Soldado Fernández, Iliana (P07-2)
López Villamizar, Iralis (P17-11)
Lórenz Fonfría, Víctor (S3.1-3, P21-3)
Lorenzo, Julia (R12m-3, P08-12, P17r-24, P17-43)
Lorenzo, Margarita (P18m-31)
Lorenzo, Ramiro (P18r-3)
Lorenzo Rivera, Julia (P17-27)
Lozano, J.J. (R20e-2)
Lozano Esteban, Elisa (R07r-5, R20r-5)
Lu, Duo (S2.1-2)
Lüders, Jens (P18-63)
Lufrano, Daniela (P08-4)
Lugilde, Ero (P18e-37)
Luigi di Salvo, Martino (P17r-26)
Lujan, Hugo D. (CP9)
Luján, R.I. (R14-3)
Lumbreras, Victoria (R08-5, P08-14, P08-15)
Lupiáñez Cara, José Antonio (R06r-7)
Luque, Neus (P21-29)
Luque Almagro, Víctor Manuel (R13-4, P13-9)
Luque Ortega, Juan Román (P15-8)
M. Calisto, Bárbara (P17-32)
M. Díaz Guerra, María José (R10-2)
Macía, Javier (CP6)
Macias, Maria (P-8, P18-66)
Macías Granados, Daniel (P13r-2)
Maddelain, Marie-Lise (P17r-20)
Maeso, Ignacio (R03-5)
Maeso Hernández, Patricia (P18e-4)
Maestro, Beatriz (R11-4, P11-5)
Maestro García Donas, Beatriz (P11-11)
Magariños Sánchez, Marta (P03r-8)
Magli, Valentina (P10m-21)
Maia, Vera (P19-1)
Majós, Carles (P12-4)
Malandrino, Maria Ida (P10m-14, P10m-21)
Maldonado, MD. (P16-4)
Malumbres, Marcos (S1.1m-4)
Mancheño, José Miguel (P17-42, P17r-44)
Manfredi, M. (P16-4)
Manso Cobos, Isabel (R13-4, P13-9)
Manyosa, Joan (P17-35)
Manzano, Anna (R10-2, P10-17, P10-20)
Manzano, José Ignacio (P15r-2)
Marais, Richard (CP2)
Marciniak, Justyna (P07-5)
Marco, Carmen (P10-9)
Marco, Diana E. (R13-1)
Marco, José Luis (P14-7)
Marco, Santiago (P-23)
Marco Garcia, Guillem (P17-25)
Marco Ramell, Anna (P12-12, P16-1)
Marcos de Mena, Tamara (P18-38)
Marešová, Lydie (P12-2)

- Marenchino, Marco (P17-3)
 Marfa, Santi (P12r-7, P12-13)
 Marí Beffa, Manuel (P02-11)
 Marín, J.J.G. (R20e-2)
 Marín, Silvia (R10-4)
 Marín Argany, Marta (P17r-53)
 Marina, Alberto (P17-38)
 Mariño, Zoe (P12r-7)
 Mariño Crespo, Óscar (P12-5)
 Mariscal Arcas, Miguel (R06-8)
 Marqués Martínez, Margarita (P21r-26)
 Márquez Cabeza, Antonio J. (R13-5)
 Marquez Garrido, Béatrice (R01-5, P01-7)
 Marquina, Maribel (P18-40)
 Marradi, Marco (P-20)
 Marrero González, Pedro F. (P10-24, P10-25, P10m-26, P10m-30)
 Marsal, Maria (R03-1)
 Martí, Elisa (S2.2-3)
 Martí, Joaquim (P17r-53)
 Martí, Ramón (R01-3)
 Martí Fàbregas, Joan (P02-33)
 Martín, Elsa (P14-3)
 Martín, M. Ángeles (P02-20)
 Martín, María Jesús (P17e-45)
 Martín, Samuel (S3.2-1)
 Martín Blanco, Enrique (R03-1)
 Martín Fernández, Mario (P10-9)
 Martín Hidalgo, David (P-3, P-9)
 Martín López, Mairena (P14-5, P14-6)
 Martín Martín, Ruth (P21-8)
 Martín Montaña, Rubén (P18e-4)
 Martín Nieto, José (P02r-23, P02-25, P18-59)
 Martín Pérez, Mari Carmen (R04-5)
 Martín Romero, Francisco Javier (P03r-2, P05r-7)
 Martín Sanz, Paloma (R18r-2, P02r-34)
 Martín Sitjar, Juana (P02-32, P-2)
 Martinelli, Luca (P17-48)
 Martínez, Ana M. (P14-1)
 Martínez, Anabel (P03r-7)
 Martínez, Fina (P10-20)
 Martínez, José Luis (P20r-2)
 Martínez, Paula (R12-1, P12-6)
 Martínez, Virginia (P02-18)
 Martínez Amorín, María (P12-5)
 Martínez Arroyo, Ana M^a (Pe-7)
 Martínez Becerra, P. (R20e-2)
 Martínez Campa, Carlos (P02e-7)
 Martínez Carrascoso, Isabel (P21-19, P21-22)
 Martínez Chantar, María Luz (R02-1)
 Martínez Conde Ibáñez, Alfonso (R09-7)
 Martínez Costa, Oscar H. (P10-3, P10-4)
 Martínez de Villarreal, Jaime (P14r-2)
 Martínez Díaz Guerra, M^a José (P18-23)
 Martínez Domínguez, David (P16-12)
 Martínez Espinosa, Rosa María (P13-8, P13-10)
 Martínez Fábregas, Jonathan (P01-6)
 Martínez Fernández, Mónica (P-1)
 Martínez Fernández, Pilar (P02-6)
 Martínez García, Marta (P15r-6, P15r-7)
 Martínez Høyer, Sergio (P18-34)
 Martínez Jiménez, Celia (P21-9)
 Martínez Jiménez, María Isabel (P15-10)
 Martínez Júlvez, Marta (P17r-8)
 Martínez Luque, Manuel (R13-4, P13-9)
 Martínez Montañés, Fernando (S2.1-4)
 Martínez Pérez, Ana Isabel (P17r-18)
 Martínez Redondo, Vicente (P07-2, P10m-12)
 Martínez Reyes, Inmaculada (P10e-2)
 Martínez Ripoll, Martín (P17-42)
 Martínez San Martín, José Luis (R01-4)
 Martínez Sebastián, María José (P02r-17, P12-9)
 Martínez Tirado, Óscar (R01-1)
 Martínez Tomé, Magdalena (R06-8)
 Martínez Villarreal, Jaime (R14r-7)
 Martínez Zorzano, Vicenta (P-1)
 Massagué, Joan (P18-66)
 Mata, Ana M. (P05r-2)
 Mateos, Luis M. (P11r-7, P12-8)
 Mateos Martín, María Luisa (P06-5)
 Matesanz, Ruth (P17r-2)
 Mathers, John C. (P07r-1)
 Maturana, Marta (P17-46)
 Mauvezin, Caroline (P-8)
 Maymó, Julieta (P18m-19, P18m-21)
 Mayor, Regina (P21-29, P21-30)
 Mayor de la Torre, Pilar (R09-1)
 Mayor Jr., Federico (R10m-3, P18m-31)
 Mayoral Moñibas, Rafael (P02r-34)
 Mayorga, Cristobalina (R11-2)
 Mazo, A. (R20e-2)
 McCormick, Peter (P18r-3)
 McDermott-Roe, Chris (R01-3)
 McKay, Jill A. (P07r-1)
 Medel Serrano, Irene (P10e-2)
 Medina, Daniel (R12r-2)
 Medina, Francisco (P02r-39)
 Medina, Juan F. (P20-5)
 Medina, Miguel Ángel (P02-11, P10-1)
 Medina, Milagros (P17r-7)
 Medina Jiménez, José María (R07r-6)
 Medina Torres, Miguel Ángel (P02-1, P02r-21)
 Medina Trullenque, Milagros (P17r-8)
 Meijer, E.W. (P11-11)
 Meijide, Susana (P16-3)
 Meitzner, Katrin (P07-6)

- Melgarejo, Esther (P10-1)
Melguizo, Angeles (P-26)
Menacho Márquez, Mauricio (S1.2-2)
Mendes, Hugo F. (P17-19)
Méndez, Raúl (P21r-33)
Méndez Marco, María Teresa (R09-5)
Méndez Zunzunegui, Ana (R19-6)
Mendoza, Noelia (P01-5)
Mensa, Laura (P12r-7)
Menyo, Sandra (P18-7)
Meo Evoli, Nathalie (P18-57)
Mera, Paula (P10m-22)
Merchán, Faustino (R13r-12)
Merkx, Maarten (P11-11)
Mesa, Socorro (R13-9)
Meseguer, Anna (P18-53, P18-54)
Mesonero, José Emilio (P20-4)
Michán, Carmen (P20r-2)
Mihailovska, Eva (Pr-16)
Millán, Jaime (R18-6)
Millán Ariño, Lluís (P10-17, P21-29, P21-30)
Millanes Romero, Alba (P21-3)
Miller, Ingrid (P12-12)
Miller, John H. (P17r-2)
Miller, Rachel K. (P18r-8)
Miñano Molina, Alfredo J. (P14-3)
Mingot, José Manuel (P03-5)
Mir, Carme (P18-54)
Mir, Joan Francesc (P10m-22)
Miralles, Joan (P11-14)
Miralles, Vicente J. (P01r-8, P10r-10)
Miralles Molina, María (P-25)
Miranda, Anibal (R10-4)
Miras Portugal, M.T. (R05-1)
Miró Obradors, María Jesús (R09-5)
Moeini, Agrin (P17r-47)
Moes, Suzette (P08-5)
Mohana Borges, Ronaldo (S3.1-2)
Mokhtari, Khalida (R06r-7)
Molina, Laura (P17-6)
Molina Alcaide, Eduarda (R11r-5)
Molina Moreno, Ricardo (P15-3)
Moline, Teresa (P05-1)
Moltó, Eduardo (S1.2-3, P21-13, P21-14)
Moltó, María Dolores (P02r-15, P02r-17, P12-9)
Mongiardini, Elias (R12-1, P12-6)
Monleón, Daniel (P10r-10)
Monsalve, Diana M. (P18r-5)
Monsalve, Eva (R10-2, P18-23)
Montañez, María Isabel (R11-2)
Monte, M^a Jesús (R16r-6)
Monte, Martín (R04-4)
Monte Río, María Jesús (R20r-5)
Montecino, Martín (CP5)
Montenegro, María Fernanda (P02-22)
Montes, L. Ruth (P05-5)
Montes Hernández, Ángel Hugo (P02-35)
Montesinos Selfa, Jorge (P02-29)
Montigny, Cédric (R05r-5)
Montilla López, Pedro (P14-10, P16-2)
Montilla Rodríguez, Marcela (P02-9)
Montoliu, Lluís (S1.2-3, R02r-5, R19r-5, P21-11, P21-13, P21-14)
Montori Grau, Marta (P18-36)
Montoro, Juan (P16-15)
Mora, Cristina (P10m-27, P10r-28, P10m-29, P18m-35)
Mora Santos, Mar (P18-13, P18-28)
Morales, Daniel (R16-9, P01-4)
Morales, María (P11-11)
Morales, Puerto (R11-4)
Morales Portillo, Arturo (P21-28)
Morales Prieto, Noelia (P20r-3)
Morales Ruiz, Manuel (P12r-7, P12-13)
Morán, José F. (P11r-9)
Moratalla, Ferran (P11-14)
Morel, Bertrand (P17-31)
Morelló, José Ramón (P16-6)
Moreno, Alicia (P08-14, P08-15)
Moreno, Estefanía (P18r-3)
Moreno, Fernando (P18r-20)
Moreno, Miguel Ángel (P15r-4, P15-10)
Moreno, Susana (P17-6)
Moreno del Álamo, Maria (P17-6)
Moreno Cermeño, Armando (R16-7, P16r-9)
Moreno Cubero, Elia (R16-9, P01-4)
Moreno Herrero, Fernando (R17-5)
Moreno Ruiz, Diego (P07m-4)
Moreno Sánchez, David (P02r-4, P02r-39)
Moreno Sanz, Fernando (P18r-25)
Moreno Vivián, Conrado (R13-4, P13-9)
Moriel Carretero, María (CP7)
Morillo Cazorla, Margarita (P17-40)
Moro, Fernando (P17r-23)
Morote, Joan (P18-54)
Motiño García Miguel, Omar (P18-29)
Mottram, Jeremy C. (R15-5)
Moussaoui, Mohamed (P17-14, P17r-17)
Muga, Arturo (P17r-23, P17r-33)
Muga Villate, Arturo (P17r-34)
Muhana, Marwan (P16-15)
Muiño-Blanco, M^a Teresa (R09-8, P01-5, P11-8)
Mulero, Miquel (R06m-4, P10-23)
Muley Vilamú, Helena (P10m-6)
Muñoz, Alberto (S1.1m-2, S1.3-1)
Muñoz, Diego (R19r-5)
Muñoz, Ivan (P18-40)

- Muñoz, Juan Pablo (P10m-11)
 Muñoz, Rosario (P17-42, P17r-44)
 Muñoz Bellvís, L. (R20e-2)
 Muñoz Cánoves, Pura (P18-26)
 Muñoz Delgado, Encarnación (P02-22)
 Muñoz Fernández, M^a Ángeles (P21-10)
 Muñoz Moruno, Purificación (P02-43)
 Muñoz Muñoz, José Luis (P10-18, P10-19)
 Muñoz Pinedo, Cristina (R01-1)
 Muñoz Saez, Emma (P14-1)
 Muntané, Jordi (R20e-3, P02-20)
 Murcia Tomás, M. Antonia (R06-8)
 Murga, Cristina (R10m-3, P18m-31)
 Murillo, M^a Divina (P18-9)
 Murillo, Serafín (P-18)
 Murray, James (P08-7)
 Murria Estal, Rosa (P02-40, P02-41)
- Nacher, Juan (P02r-15)
 Nadal, Belén (P18-61)
 Nadal Ribelles, Mariona (P21r-27)
 Nadal Serrano, Mercedes (P02e-24, P16m-7)
 Nájjar, Elena (P08-14, P08-15)
 Nájjera, Cindy (P13-10)
 Naudí, Alba (R16-4)
 Navallas, Maria del Carmen (P17-46)
 Navarrete, Clara (P12-2)
 Navarro, José A. (R05-2, P05-3)
 Navarro, Miguel (R15r-3, P15r-5)
 Navarro, Rosaura (P16-3)
 Navarro Carruesco, José Antonio (P01-6)
 Navarro González de Mesa, Elisa (P01e-2)
 Navarro Llorens, Juana Maria (P12-11)
 Navarro Sabaté, Àurea (R10-2, P10-17, P10-20)
 Navasa, Miquel (P12r-7)
 Nazmi, Kamran (P15-9)
 Neira, José Luis (P17-3)
 Neto, Ana (S1.2-3)
 Nguyen, Phuong (P17e-36)
 Nicolás Alonso, Silvia (P21r-26)
 Nieto, M. Ángela (P03-5)
 Nieto Callejo, María Luisa (P18e-4)
 Nieto Garai, Jon Ander (R05-6)
 Nieto Pintado, Raquel (P21-25)
 Nieto Romero, Virginia (P21r-26)
 Nieto Vazquez, Iria (R10m-3, P18m-31)
 Niisuke, Katrin (P07-2)
 Niso Santano, Mireia (P01-1, R01-6)
 Nöbauer, Katharina (P12-12)
 Nogués, Isabel (P17r-26)
 Nogués, M. Victòria (P17-14), P17r-17, P17r-22)
 Northcote, Peter T. (P17r-2)
- Novellademunt, Laura (R10-2, P10-17)
 Novials, Anna (P-18)
 Núñez de Arenas, Cristina (P10e-2)
- O Connor, José Enrique (P16-14)
 Obach, Mercè (P10-17)
 Obiol Pardo, Cristian (P11-14)
 Obis, Èlia (R16-7, P16r-9)
 Obrador Hevia, Antònia (P01-9, P18-52, P18-56)
 Obregón, David W. (P08-12)
 Ocaña Calahorro, Francisco (P13-6)
 Ojeda, Irene (P14-1)
 Olangua, Luis (P11r-9)
 Olano, N. de (P18-67)
 Olea Serrano, Fátima (R06-8)
 Olier, Iván (P12-2)
 Oliva, Baldomero (S3.2-3)
 Oliva, José Luis (P18e-17)
 Oliveira, A. Sofia (S3.1-4)
 Oliver, Jordi (P16m-7)
 Oliver, M.D. (R18-4)
 Oliver, Paula (R06-2, R09-2)
 Oliver Oliver, Jordi (R09-4, P02e-24)
 Olivera, Eliandre (P08-13)
 Oliveras, Anna (R05-7)
 Olmo López, Nieves (P01e-2)
 Olmo López, Rosa (R09-1, P16-13)
 Olsnes, Sjur (P17-5)
 Ordinas, Carlos (P01-9)
 Ordoñez Morán, Paloma (S1.1m-2)
 Orel, Mikhail (P17-35)
 Orellana Gavaldà, Josep Maria (P10m-14)
 Oropeza, Maira (R08-7)
 Orozco, Allan (R09m-3)
 Ortega, Esther (P17-15)
 Ortega, Fernando (P10-8)
 Ortega, Natividad (P-14, P-15)
 Ortega, Sagrario (R19r-5)
 Ortega Galisteo, Ana P. (R08-3)
 Ortega Sánchez, Esperanza (P02e-13)
 Ortega Senovilla, Henar (R07-2, P07-6)
 Ortiz López, Antonio (P05-6, P17-16)
 Osada García, Jesús (R09-5)
 Otaegui, Pedro (P10r-15)
 Otero Bilbao, Anabel (P17-27)
 Otero Casas, José (R17m-2)
 Otero Estévez, Olalla (P-1)
 Ouro, Alberto (P18-11)
- P. Acebrón, Sergio (P17r-23)
 Padrós, Esteve (S3.1-3, P14-8, P17-25, P17-35)

- Paez de la Cadena, María (P-1)
Pagès, Montserrat (R08-5, P08-13, P08-14, P08-15, P08-16, P08-17)
Pajuelo Domínguez, Eloisa (R13-8)
Palacín, Manuel (P-8, P10m-11)
Palacios, David (P-14, P-15)
Palacios Alaiz, Evangelina (R09-5)
Pallares, Irantzu (P17r-39)
Pallarès, Víctor (P06-1)
Palma, Imma (P-18)
Palomino Morales, Rogelio (P18-49)
Palou, Andreu (R06-2, R06-6)
Palou March, Mariona (P06-3, P07r-1)
Palou Oliver, Andreu (R09-2, P06-3, P07r-1)
Pamplona, Reinald (R16-4, P16m-10)
Pañeda, Astrid (P10m-14)
Pardo, Antonio (P-23)
Pardo, Julián (R01-2)
Pardo, Miguel Ángel (S3.2-1)
Pardo, Rosario (R02m-4, P02-2)
Pardo Carrasco, Leonardo (P14-11)
Parés, Xavier (P17e-45, P17r-47)
Parra, Maribel (R12-6)
Parrilla, Roberto (P02r-16, P18-55)
Pascual Ahuir, Amparo (S2.1-4)
Pascual García, Pau (P21-7, P21-9)
Pascual Montano, Alberto (P21-13)
Pastor Anglada, Marçal (R20e-2, P20-5)
Pastor Flores, Daniel (P18r-22)
Pato González, Raquel (P16-1)
Paz, José C. (P10m-11)
Pazmino, Diana (R08-3)
Pedelini, Leda (P20r-3)
Pedraz, Elena (P18-16, P18r-47)
Pedro Roig, Laia (R13-6, P13-8)
Pedrós, Ignacio (P02-27)
Peeters, Tom (CP6)
Peiró, Sandra (P21-3)
Pekkala, Satu (P17r-18)
Peláez, Fernando (P-26)
Peláez Cristóbal, Rafael (P18r-25)
Pelechano, Vicent (P21r-31)
Peña Moreno, Fernando de la (R13-4)
Peña Rico, Miguel Ángel (P10-20)
Peña Román, Raquel (P16-1)
Penades, Soledad (P-20)
Peper, Marcela (P18r-3)
Pera Gresely, Benet (P17r-2)
Peracaula, Rosa (P02m-42)
Peragón Sánchez, Juan (R06r-7)
Perales, Alfredo (P03r-7)
Perales Romero, Sonia (P18-49)
Perdiguero, Eusebio (P18-26)
Perdomo Hernández, Germán (P-4)
Pereiro, Eva (S3.3-3)
Pérez Pé, Rosaura (P01-5)
Perera, Julián (P12-11)
Pérez, Javier (P10-7)
Pérez, Juan Jesús (P17-41)
Pérez, María José (R16r-6)
Pérez, Nieves (P02-8)
Pérez Albarsanz, Miguel Ángel (Pr-24)
Pérez Alea, Mileidys (R14r-6)
Pérez Amador, Miguel (R08-1)
Pérez Castiñeira, José R. (P05-4)
Pérez Delgado de Torres, Carmen María (R13-5)
Pérez Garay, Marta (P02m-42)
Pérez García, Vicente (S2.3-2)
Pérez Gil, Jesús (R05r-3, P05-8, P17-12)
Pérez Gil, Jordi (P17-32)
Pérez Guijarro, Eva (P21-14)
Pérez Inestrosa, Ezequiel (R11-2)
Pérez Jiménez, Jara (P06-5)
Pérez Martí, Albert (P10-25, P10m-30)
Pérez Martín, Marta (P08-5)
Pérez Mateos, Manuel (P-14, P-15)
Pérez Moreno, Guiomar (R15-2, P15-11)
Pérez Ortín, José Enrique (R12r-2, P21r-31)
Pérez Pérez, Antonio (P18m-19, P18m-21)
Pérez Pérez, María Esther (P08-3, P08-5)
Pérez Pertejo, Yolanda (P15-1, P15-3)
Pérez Pulido, Antonio J. (P14r-12)
Pérez Riba, Mercè (P18-34)
Pérez Sampietro, María (P18-42)
Pérez Sen, R. (R05-1)
Pérez Torras, S. (R20e-2)
Perez Urzelai, Itxaro (P02-31)
Pérez Valle, Jorge (P12-2)
Pérez Verdaguer, Mireia (P05-1)
Pérez Victoria, Ignacio (P15r-6, P15r-7)
Pérez Victoria, José María (R15r-1, P15r-6, P15r-7)
Pericacho, Miguel (P02r-16, P18-55, P19-1)
Petegnief, Valérie (P14-9)
Peter, Matthias (P21r-27)
Petreszélyová, Silvia (P12-2)
Petrini, John H.J. (S1.1m-3)
Petruccelli, Silvana (P06-2)
Petry, Harald (P10m-14, P10m-22)
Pich, Sara (P10m-11)
Picó Segura, Catalina (R09-2, P06-3, P07r-1)
Pihan, Philippe (CP5)
Pilar Izquierdo, María C. (P-14, P-15)
Pimentel, María (R18r-2, P16-15)
Pineda Molina, Estela (P17-49, P18-50)
Piñeiro, Cristina (R03-5)

- Pinent, Montserrat (R06m-4, P06-1)
 Piñol, Jaume (P17-48)
 Pintado, Cristina (P10m-27, P10r-28, P10m-29)
 Pintado, Elizabeth (P18-59)
 Pintado Losa, Cristina (P18m-35)
 Pinti, Marcello (P16-14)
 Pinto, Francisco M (P03r-9)
 Pinto, Rosa María (P17-11)
 Pinto, Sandra (P16-14)
 Pire Galiana, Carmen (P13-8)
 Pires, Fabio (S1.3-1)
 Pita, Guillermo (R02r-5)
 Pizarro Estrella, Elisa (R01-6, P01-1)
 Plana, Maria (P18-53, P18-54)
 Planas, Anna M. (P14-9, P-22)
 Planell, Raquel (R12-1, P12-6)
 Platara, Maria (P18-18, P18r-44)
 Plaza, Miguel Ángel (P18-9)
 Poli, Evelyn (R07r-5)
 Pollmann, Stephan (R08-4)
 Ponce Rodríguez, Ana (P04-1)
 Pons, Daniel Gabriel (P02e-24, P16m-7)
 Ponte, I. (P17-50)
 Porras, Almudena (P18-12, P19-1)
 Porras, Gracia (P02-5)
 Porta de la Riva, Montserrat (P21-6)
 Porté, Sergio (P17e-45, P17r-47)
 Portero Otín, Manel (R16-4, P16m-10)
 Portillo, Francisco (P03-5)
 Portillo, María del Puy (R06-3)
 Posada Moreno, Paloma (R09-7)
 Posas, Francesc (CP6, P21r-27)
 Pouille, Philippe Alexander (R03-1)
 Pozo, Macarena (P10m-22)
 Pozo Guisado, Eulalia (P03r-2, P05r-7)
 Prado Ruiz, Adelina (P17r-34)
 Prados, José Carlos (P18-49)
 Prat, Salomé (S2.2-2)
 Prat Rojo, Carla (R03-1)
 Priego, Neibla (P18-12)
 Priego Cuadra, Teresa (R09-2, P06-3, P07r-1)
 Prieto, M. Auxiliadora (P11-5)
 Prieto Alamán, José Antonio (P18r-27)
 Prieto Chinchilla, Patricia (R18r-2)
 Prieto Jiménez, María Auxiliadora (R13-4)
 Priolo, Nora (P08-12)
 Proenza, Ana M. (P10-13)
 Proft, Markus (S2.1-4)
 Prokop, Izabela (P07-5)
 Proto, William (R15-5)
 Puig, Isabel (S1.1m-2)
 Puig Martínez, Marta (P-21)
 Pujadas, Gerard (R06m-4, P10-23)
 Pujol, Anna (R19-4, P10r-15)
 Pujol Vidal, Magdalena (P10m-30)
 Pulice, Giuseppe (R10-5)
 Pulido, David (P17r-17)
 Pulido, Pablo (P08-11)
 Pulido, Rafael (R18-4, P18e-58, P18-60)
 Puntarulo Capriolo, Susana (R16-11)
 Puyet, Antonio (S3.2-2)
 Queralt, Ethel (P02-14)
 Quero, Juan Ismael (P14-10)
 Quesada, Alberto (P11-4)
 Quesada, Ana R. (P02-11)
 Quiles, María Ángeles (P10-7)
 Quintana Alcalá, Juan (P02-5)
 Quirós, Luis Manuel (R08-6, P02r-12, P-13)
 R. Carbó, Laia (P17e-36)
 R. Chacón, Matilde (P02m-19)
 Rabissi, Agnese (R08-5)
 Radis Baptista, Gandhi (P15-8)
 Raducu, Madalina (P02r-23, P02-25)
 Radusky, Leandro (R04-4)
 Ramírez, Bartolomé (P16-6)
 Ramírez, Laura (R02r-5)
 Ramírez, Omar (R16-4)
 Ramírez, Ramón (P10r-28)
 Ramírez Bajo, María José (P10-8)
 Ramírez Cebollero, Luis (Pr-24)
 Ramírez Flores, Sara (P10m-6)
 Ramírez Peinado, Silvia (R01-1)
 Ramiro, Almudena R. (S1.2-1)
 Ramis, Guillem (P02-28)
 Ramon, Eva (P17-19, P17-40)
 Ramón y Cajal, Santiago (P05-1, P18-54)
 Ramos, José (R20r-7, P12-2, P18-40, P20-1, P20r-2, P20r-3)
 Ramos, Juan L. (S2.1-2, P18-50)
 Ramos, Sonia (P02-20)
 Ramos Álvarez, María del Pilar (P07-5, P07m-4, P07e-7)
 Ramos Amaya, Ana (P02r-39)
 Ramos Hernández, Isbaal (P17r-34)
 Randall, Rebecca A. (P02e-38)
 Rández Gil, Francisca (P18r-27)
 Rangel Barajas, Claudia (P18r-3)
 Raposo González, Rafaela (R09-5)
 Ratera, Mercè (P17-48)
 Razzazi Fazeli, Ebrahim (P12-12)
 Real, Sebastian (P18-57)
 Recio, M. Natividad (Pr-24)

- Redondo, Inmaculada (P20-1)
Redondo Muñoz, Javier (S2.3-3)
Regot, Sergi (CP6)
Reguant, Jordi (P16-6)
Reguart Aransay, Noemí (P-21)
Regué, Laura (R18-1, P18-39)
Reguera Torres, Rosa María (P15-1, P15-3)
Relat Pardo, Joana (P10-25, P10m-30)
Remesar Betllloch, Xavier (P06-4)
Requena, José María (P15-3)
Requena Torres, C. (P21-18)
Retamosa, Maria de Gracia (R11-4, P11-10)
Reulen, Sanne (P11-11)
Reverter Cendrós, David (P17-27)
Revilla, Eva (P03-3, P03-4)
Reyes, María Edith (P18-59)
Reyes Alcaraz, Arfaxad (P17-40)
Reyes Darias, José Antonio (P18-50)
Reyes Rosa, José Carlos (P21-2, P21-5)
Reyes Zurita, Fernando (R06r-7)
Reynés, Bàrbara (R06-2)
Riancho del Moral, José Antonio (P10-7)
Ribas Serna, J. (P16-4)
Ribeiro, João Meireles (P17-11)
Ribera, Albert (R19-4)
Ribó Panosa, Marc (P11e-2)
Ribot, Joan (R06-6, R09-2)
Ricco, Natalia (P18-7)
Rico, Beatriz (R02-2)
Rico Díaz, Agustín (P21-12)
Rienzo, Alessandro (S2.1-4)
Riera, Marta (P08-16, P08-17)
Rigau, Joan (R08-2)
Ríos Marco, Pablo (P10-9)
Riu, Efrén (P10r-15)
Rivas, Luis (P15-8, P15-9)
Rivera Hernández, Geovanny (P17r-53)
Rivero, Samuel (R10-2)
Roa Strauch, Juan Carlos (P21e-34)
Robles, Eloy (P13-4)
Roca, Carles (P10r-15)
Roca, Pilar (P16m-7)
Roca Salom, Pilar (R09-4, P02e-24)
Rodes, María José (R11-4, P11-10)
Rodrigo Bravo, Ismael (P08-9, P08-10)
Rodrigues, Joaquim Rui (P17-11)
Rodrigues Poveda, Carlos (R15-2, P15-11)
Rodríguez, Carmen R. (R14-5)
Rodríguez, Claudia (P10-3, P10-4)
Rodríguez, Isabel (P03-3)
Rodríguez, Joan Carles (P18-16, P18r-47)
Rodríguez, José (P01-9, P02-28, P18-52, P18-56)
Rodríguez, María (P10m-29)
Rodríguez, María Josefa (S3.3-3)
Rodríguez Aburto, María (P03r-8)
Rodríguez Álvarez, José (P14-3)
Rodríguez Arrondo, José Luis (R05-6, P17-28, P17-54)
Rodríguez Asiain, Arantza (P18e-6, P18r-15)
Rodríguez Bayona, Beatriz (P02r-39)
Rodríguez Belmonte, Esther (P21-15)
Rodríguez Berrocal, Javier (P-1)
Rodríguez Cantalejo, Fernando (P16-2)
Rodríguez Caso, Luis (P02-1)
Rodríguez Colman, María José (P10r-5)
Rodríguez Concepción, Manuel (P17-32)
Rodríguez Cuenca, Sergio (R10-4)
Rodríguez de la Vega Otazo, Mónica (P17-27)
Rodríguez Díaz, Jesús (P02-37, P17-10, P17-38)
Rodríguez Enriquez, Isabel (P03-4)
Rodríguez Guerrero, Ana M. (R09-2)
Rodríguez Llorente, Ignacio D. (R13-8)
Rodríguez López, José Neptuno (P10-18, P10-19)
Rodríguez Macias, Rocío I. (R07r-5, R20r-5)
Rodríguez Marcos, Ana (P02-18)
Rodríguez Martorel, Javier (P02-9)
Rodríguez Moreno, Antonio (R14-4)
Rodríguez Navarro, Susana (CP10, P21-7, P21-9)
Rodríguez Nebreda, Ángel (S2.1-1)
Rodríguez Peña, María Sol (P10m-14)
Rodríguez Pérez, María (P18m-35)
Rodríguez Porrata, Boris (R18r-3)
Rodríguez Quesada, Ana (P02-1, P02r-21)
Rodríguez Ramos, M. Rosario (P07-5)
Rodríguez Rey, José Carlos (P10-7)
Rodríguez Rodríguez, José Antonio (P02-14)
Rodríguez Romero, Marta (R20e-3)
Rodríguez Salarish, Javier (P17r-2)
Rodríguez Sanz, Aranzazu Isabel (P02-18)
Rodríguez Serrano, María (R08-3)
Rodríguez Ubreva, F. Javier (P18-29)
Rodríguez Concepción, Manuel (P08-11)
Roig, Joan (R18-1, P18-39, P18-63)
Roig, Sara (R05-7)
Roitberg, Adrian E. (R04-1)
Rojas, Adriana (CP5)
Rojas, Cristina (P10-23)
Rojas, José María (P18e-17)
Rojas González, José Antonio (P08-1, P08-6)
Rojas Ríos, Patricia (S2.2-1)
Roldán Ruiz, María Dolores (R13-4, P13-9)
Román, Alina (P17r-29)
Román, Ángel C. (S1.2-3)
Romanque Ulloa, Pamela (P16-5, P16-8)
Romero, Francisco (P18-13, P18-28)
Romero, M.R. (R20e-2)

- Romero Fernández, Wilber (R14r-6, P17-41)
 Romero Portillo, Francisco (P01-7)
 Romero Puertas, María (R08-3, P08-6)
 Roodveldt, Cintia (P17-9)
 Ropero Salinas, Santiago (P21e-20, P21r-32)
 Roque, A. (P17-50)
 Ros, Joaquim (R16-2, R16-7, P10r-5, P16r-9)
 Rosa, José Luis (P10-17)
 Rosales Rodríguez, Rubén (R20e-3)
 Rosario Gómez, Claudia (R06-8)
 Rotllán, Pedro (R14-5)
 Roura Ferrer, Meritxell (R05-7)
 Royo, Miriam (P-8)
 Rozas, J.L. (R14-3)
 Rubinstein, Marcelo (P18r-3)
 Rubio, Marcos (P02r-23)
 Rubio, Vicente (P17-38)
 Rubio, Virginia (R16-9, P01-4)
 Rubio López, Teresa (R10m-6)
 Rubio Martínez, Jaime (P11-14)
 Rubio Novella, Silvia (P01-6)
 Rubio Vidal, Nuria (S3.3-2)
 Rubio Zamora, Vicente (P17r-18)
 Rufino Palomares, Eva. E (R06r-7)
 Ruiz, Amparo (P18-18, P18r-33, P18-40)
 Ruiz, Félix A. (P02r-4, P02-9, P02r-39)
 Ruiz, Xavier (P17e-45)
 Ruiz Babot, Gerard (P18r-15)
 Ruiz Badot, Gerard (P18e-6)
 Ruiz Bonilla, Vanessa (P18-26)
 Ruiz Borrego, Manuel (R01-5)
 Ruiz García, Almudena (P18-23, R10-2)
 Ruiz Gómez, Mar (R03r-6, P03r-1)
 Ruiz Hidalgo, M^a José (P18-23)
 Ruiz Larrea, M. Begoña (P16-3)
 Ruiz Meana, Marisol (R01-3)
 Ruiz Pérez, Luis Miguel (R15-2, P15-11, P21-18)
 Ruiz Pérez, M^a Victoria (P10-1)
 Ruiz Sánchez, Antonio Jesús (R11-2)
 Ruiz Sanz, José Ignacio (P16-3)
 Russiñol, Nuria (P02-14)
 Ruzafa, David (P17-31)
- S. de Groot, Natalia (P17r-33)
 Sabaté, Raimon (P17r-33)
 Sabater Martínez, David (P06-4)
 Saco Rodríguez, Yolanda (P16-1)
 Sacristán, Raquel (R08-1)
 Sáez, Guillermo (P16-15)
 Sáez Ibáñez, Ana Rosa (P02r-15)
 Sáez Mata, L. (P-15)
- Sáez Melero, Lara Paloma (R13-4, P13-9)
 Sáez Torres, Carmen (R01-5, P01-7)
 Safo, Martin K. (P17r-26)
 Sahrawy Barragán, Mariam (P08-1, P08-6)
 Sainz, Jesús (P10-7)
 Sala, David (P-8, P10m-11)
 Sala de Oyanguren, Francisco (P16-14)
 Salamanca, Aurora (P10m-27, P10r-28, P10m-29, P18m-35)
 Salas, Azucena (P02m-36)
 Salazar, Sergio (P13-4)
 Salazar, Vivian (P17-14)
 Salazar Fernández de Gamarra, Renaldo José (R08-7)
 Salcedo González, Israel (P21r-26)
 Saldivia, Manuel (P15r-5)
 Salehi, Rasoul (P17-49)
 Salto González, Rafael (P21-28)
 Salvadó, M. Josepa (R06m-4)
 Salvador Ibáñez, Ana M^a (R05-6, P17-28)
 Salvatella, Xavier (P17-9)
 Samadi, Abdelouhaid (P14-7)
 Sánchez, Francisco Manuel (R16-10)
 Sánchez, Ignacio Enrique (R04-4)
 Sánchez, Inés (P18-55)
 Sánchez, Julia (P16-15)
 Sánchez, Patricia (P02-18)
 Sánchez, Valentina (P10-3, P10-4)
 Sánchez Alonso, María Gracia (P07m-4)
 Sánchez Aragón, María (P10e-2)
 Sánchez Ayuso, Matilde (P02r-16, P18-55)
 Sánchez Azqueta, Ana (P17r-8)
 Sánchez Bautista, Sonia (R05-4)
 Sánchez Bernal, Carmen (P02-8)
 Sánchez Calderón, Hortensia (P03r-8)
 Sánchez Carrón, Guiomar (R11-6, P11-3, P11-13)
 Sánchez Cenizo, Laura (P10e-2)
 Sánchez de Groot, Natalia (P17-52)
 Sánchez Ferrer, Álvaro (R11-6, P11-3, P11-13)
 Sánchez Giraldo, Raquel (P17-46)
 Sánchez Hernández, Irene (P18r-24)
 Sánchez Jiménez, Carmen (P21-19, P21-22)
 Sánchez Jiménez, Flora (P18m-19, P18m-21)
 Sánchez Jiménez, Francisca (P02-1, P10-1)
 Sánchez López, Fernando (R16-10)
 Sánchez López, Yurena (Pr-24)
 Sánchez Margalet, Víctor (P18m-19, P18m-21)
 Sánchez Marinas, A. (P18-67)
 Sánchez Martínez, Diego (R01-2)
 Sánchez Medina, M^a Pilar (P02e-13)
 Sánchez Navas Parejo, Inés (P02r-16)
 Sánchez Osuna, María (R01-7)
 Sanchez Pérez, A. (P-6)
 Sánchez Puelles, José M. (R11-1)

- Sánchez Roig, Juana (R09-2, P06-3, P07r-1)
Sánchez Ruiz, José Manuel (R04-2)
Sánchez Sánchez, Beatriz (P16r-11)
Sánchez Vera Gómez Trelles, Isabel (R06-5)
Sánchez Vicente, Laura (R11r-5)
Sánchez Yagüe, Jesús (P02-8, P16r-11)
Sanchís, Daniel (R01-3, P16r-9)
Sanchís, Yovana (P15r-2)
Sancho, Ana (P-8)
Sancho, Javier (P12-3, P17-52)
Sancho, Pilar (P01-4, P18-48)
Sancho Sanz, Javier (P17r-20, P17r-30)
Sandalio González, Luisa María (R08-3, P08-6)
Sanjuan, Julio (P02r-15)
Sanjuan Garriga, Gabriel (P04-1)
Santacatterina, Fulvio (P10e-2)
Santalucía, Tomas (P14-9)
Santalucía Albi, Tomás (P-22)
Santamaría, David (R02-3)
Santamaría, Jesús (P-20)
Santana, Ulises (P20r-3)
Santaolalla Montoya, Francisco (P02-31)
Santiago Gómez, Angélica (P01e-2)
Santibáñez Cofré, Catherine (P16-5)
Santisteban, Pilar (S2.3-1)
Santos, J. (R15-4)
Santos, Marta (R11-3, P11r-12)
Santos, Nuno C. (S3.1-2)
Santos Cuesta, Marta (P-11)
Sanz, Jesús Miguel (R11-4)
Sanz Andreu, Luis (P08-7)
Sanz Bigorra, Pascual (R10m-6)
Sanz Echevarría, Begoña (P02-31)
Sanz Ezquerro, Juan José (R03-4)
Sanz García, Marta (P02r-3, P17r-4, P18r-5)
Sanz Luque, Emanuel (P13-6)
Sanz Morales, Jesús M. (P11-5, P11-10, P11-11)
Saperas, Nuria (P17-46)
Sardina, José L. (P16r-11)
Sarmiento, Nancy (P02-8)
Sarró, Eduard (P18-53)
Sastre Serra, J. (P02e-24, P16m-7)
Saura, Andreu (P11-14)
Saura, Carlos A. (P14-3)
Saura, Josep (P21-24)
Saus, Juan (P02-37)
Schaefer Graf, Ute (P07-6)
Schapira, Anthony H (R01-6)
Schierle Kaminski, Gabriele (P17-9)
Schirch, Verne (P17r-26)
Schneider, Gerd (S3.3-3)
Sdelci, Sara (R18-1, P18-39)
Sealey Cardona, Marco (R15-2)
Sebastián, David (P10m-11)
Segalés, Jessica (P10m-11)
Segovia, Josefa L. (P10-9)
Selgas, Rafael (P02-18)
Selivanov, Vitaly (R10-4)
Sepulcre, Francesc (P14-8)
Sepúlveda, Hugo (CP5)
Sepúlveda, M. Rosario (P05r-2)
Serafín, Anna (R01-3)
Serna, Eva (P10r-10)
Serra, Albert (P18r-44)
Serra, Dolors (P10m-14, P10m-21, P10m-22)
Serra, Juan Luis (R11-3, P11r-12)
Serra Cucurull, Dolors (R10-1, P10m-6)
Serra Ferrer, Juan Luis (P-5, P-11, P13-3)
Serra Sitjar, Margalida (P18-56)
Serra Vich, Francisca (R09-2)
Serrano, Ana (P17-6, P17r-7)
Serrano, Aurelio (P05-4)
Serrano, M^a Ángeles (R16r-6, R20e-2)
Serrano, Raquel (P18-18)
Serrano Blesa, Edith (P11-8)
Serrano Candelas, Eva (P18-34)
Serrano Casasola, José (P16m-10)
Serrano Delgado, Aurelio (P08m-8)
Serrano Marco, Lucía (P18-36)
Serrano Pubull, Luis (CP8)
Serrato Recio, Antonio Jesús (P08-1, P08-6)
Serratos, Joan (P21-24)
Seruggia, Davide (P21-11)
Sesé, Borja (P21-30)
Sevillano, Julio (P07m-4)
Sevillano Fernández, Julio (P07-5, P07e-7)
Sierra, Javier (P03-3)
Sierra Isturiz, Javier (P03-4)
Sierra Muñoz, Rocío (R03-3)
Siles, Maite (P16-3)
Silva, Tânia (P15-9)
Simbari, Fabio M. M. (P18-51)
Simões, Isaura (P08-4)
Simón, Carlos (Pe-7)
Simón García de Mora, Gloria Pilar (P01r-3, P18-48)
Singh, Jonathan (P17r-2)
Siverio, José M. (R13-11)
Siverio Expósito, José Manuel (R13-10)
Soares, Cláudio M. (S3.1-4)
Sobrado de Vicente Tutor, Antonio (R03r-6)
Sobрино, Francisco (P18-59)
Sola, Carme (P21-24)
Sola Carvajal, Agustín (R11-6, P11-3, P11-13)
Solà Vilarubias, Maria (R17m-3)
Soldati Favre, Dominique (R15-4)
Solé, Laura (R05-7)

- Solé, Montse (P02-30, P14-3)
Solé, Ricard (CP6)
Solé Serra, Carme (P21r-27)
Somoza, Rosa (P05-1)
Sonnenberg, Arnoud (P17-15)
Sordo Juanena, José María (R09-5)
Sorianello, Eleonora (P10m-11)
Soriano, Sirena (P02r-17, P12-9)
Sot, Jesús (P05-5)
Sotelo, Natalia Soledad (P18e-58)
Soto Palomino, Eva (P04-1)
Soto Suárez, Mauricio (P08-1, P08-6)
Soukri, Abdelaziz (P08m-8)
Spickett, Corinne (R16-4)
Stagilar, Igor (P14-11)
Stanisavljevic, Jelena (P21-6)
Straccia, Marco (P21-24)
Stracker, Travis H. (S1.1m-3)
Strauss, Erick (P18-32)
Stumpf, Miriam (P18-60)
Suárez, Teresa (R01-4, P03r-6)
Suárez Pereira, Irene (P14r-12)
Suau, P. (P17-50)
Subirán, Nerea (P03r-9)
Subirana, Juan Antonio (P17-46)
Sureda, Francesc (P02-27)
Sychrová, Hana (P12-2, P20r-2)
- Tabernero, Josep (S1.1m-2)
Tabernero Urbietxa, Arantxa (R07r-6)
Talavera Gutiérrez, Amaia (P02-22)
Tamarit, Jordi (R16-7, P16r-9)
Tanco, Sebastián (R12m-3, P08-12, P17-27, P17-43, P17r-24)
Tapia Opazo, Gladys (R16-11)
Tarakanov, Alexander O. (R14r-6)
Tarazona, Sonia (S3.2-1)
Tárraga Herrero, Susana (P08-9)
Tarrats, Núria (P18-36)
Tasset Cuevas, Inmaculada (R16-10, P14-10, P16-2)
Tatjer, Laura (R18r-3)
Tauler, Albert (P18-57)
Tavárez Alonso, Sandra (P02-40, P02-41)
Teijón López, César (R09-7, P16-13)
Teijón Rivera, José María (R09-1, P16-13)
Teiletxea Malda, Edurne (P11r-9)
Teixeira, Mariana (R10-5)
Teixidó, Laura (R01-7)
Teixidó Travessa, Neus (P18-63)
Tejedor, M^a Cristina (R16-9)
Tellechea, Mariana (P08-12)
Tena, Juan (R03-5, P21-13)
- Tena Campos, Mercè (P17-41)
Tenbaum, Stephan (S1.1m-2)
Terme, Jean Michel (P21-29, P21-30)
Terrados, Gloria (R01-4)
Teruel, N. (P17-50)
Teruel Puche, José A. (P05-6, P17-16)
Thomàs Moyà, Elena (P02-28)
Tiana, María (P21-14, P21r-15)
Tirado Vélez, José Manuel (P-4)
Tisserand, Johan (R10-5)
Toc, Diana (P18-7)
Toledo, Darwin (P17-19, P17-40)
Tolozza, Lorena (P12-10)
Tomás Martín, Patricia (P05r-7)
Tormo, José Rubén (P-26)
Tormos, Carmen (P16-15)
Tormos, Enrique (P03r-7)
Torreblanca Gonzales, Renzo (P17r-30)
Torrens García, Juana María (P06-3)
Torrent, Gerard (P12-6)
Torrent, Marc (P17-14, P17r-17, P17r-22)
Torres, David (P10-4)
Torres, Josep Lluís (P06-5)
Torres, Luis (P01r-8, P10r-10)
Torres, María J. (R11-2, R13-9)
Torres de Pinedo, Jesús M. (P02e-13)
Torres Perales, Carolina (P18-49)
Torres Sánchez, Miguel (R03-3)
Torret, Gerard (R12-1)
Torrónteras Santiago, Rafael (P16-12)
Tort, Olivia (P17r-24)
Tortolero, María (P01-7, P18-13, P18-28)
Tortosa, Avelina (P10-20)
Tortosa, Germán (R13-1)
Tous, Cristina (CP7)
Trejo, Sebastián Alejandro (P06-2, P17r-24)
Trigili, Chiara (P17r-2)
Trilla, Enric (P18-54)
Trueba, Miguel (P18-11)
Trullàs, Ramon (P14-3)
Tudela, José (P10-18, P10-19)
Túnez Fiñana, Isaac (R16-10, P14-1, P16-2)
Turk, Martina (P20r-2)
Turnay Abad, Javier (P01e-2)
Tusell, Josep M (P21-24)
- Unzeta, Mercedes (P02-30, P14-7, P16-6)
Urbán, Ilona (P-1)
Urbez, Cristina (R08-1)
Urbina, Julio A. (R15-2, P15-11)
Uribe, Verónica (R03-4)
Urizar, Itziar (P03r-9)

- Vairo Cavalli, Sandra (P08-4)
Valbuena, Alberto (P21-1)
Valdivia, Asier (P03r-9)
Valdivieso, Fernando (R19r-5)
Valiente, Miguel (P18e-58)
Valladares Hernández, Basilio (P15-12)
Valle Garay, Eulalia (P02-35)
Valle García, Javier (P17r-22)
Vallejo, Albert (R05-7)
Valles, S.L. (P-6)
Valls, Cristina (P10-23)
Valls, Gabriela (P18e-37)
Valls Bellés, Victoria (P-25)
Valls Sierra, Gabriela (P18r-8)
Valpueda, José María (R17-5)
Valverde, Ángela M. (P02-20)
Valverde Pareja, Héctor (P17-21)
Van Coster, Rudy (P02r-23)
Van Damme, Petra (R12m-3)
Van Deventer, Sander (P10m-14, P10m-22)
Van Raaij, Mark Johan (R17m-2)
Vandekerckhove, Joël (R16-12)
Vaquero, Alejandro (R16-1, P14-9)
Vaquero, Juan José (P02-18)
Vaquero Rodríguez, Javier (R20e-3)
Varas, Laura (P03-3, P03-4)
Varela, Lorena (P17-31)
Varela Nieto, Isabel (R03-2, P03r-8)
Varón, Ramón (P10-18, P10-19)
Varone, Cecilia (P18m-19, P18m-21)
Vavrova Anderson, Jana (S1.2-3)
Vázquez, Antonio (P16-15)
Vázquez, E. (R14-3)
Vázquez Carballo, Ana (P02m-19, P18-12)
Vázquez Carrera, Manuel (P18-36)
Vázquez Cedeira, Marta (P17r-4)
Vázquez Hernández, María (P05r-2)
Vázquez Ibar, José Luis (R17-4)
Vega, Sonia (P03-5)
Vegara, Anna (R13-6)
Veiga, Ana Salomé (S3.1-2)
Velasco Criado, Ana (R07r-6)
Velázquez Campoy, Adrián (P17-52, P17r-7)
Vélez Bermúdez, Isabel Cristina (P08-16)
Vendrell, Joan (P02m-19)
Vendrell, Josep (P17r-39)
Vento, Máximo (P03r-7)
Ventoso, Iván (P21-10)
Ventura, Francesc (P10-17)
Ventura, Salvador (P12-3, P17r-33, P17-51, P17-52)
Vera Sirera, Francisco (R08-1)
Verdaguer Massana, Nuria (S3.1-1)
Vernia Miralles, Santiago (R10m-6)
Viana Arribas, Marta (R06-5)
Vicente, Francisca (P-26)
Vicente, Raquel (P20-4)
Vicente García, Cristina (S1.2-3, P21-13)
Vidal, A. E. (P15-11, P21-18)
Vidal, Cecilio J. (P02-22)
Vidal, Isabel (R15r-3, P15r-5)
Vidal Vanaclocha, Fernando (P02m-42)
Videla Cabrera, Luis Alberto (R16-11, P16-5, P16-8)
Vila, Cristina (P18-61)
Vila Bedmar, Rocío (R10m-3, P02m-19, P18m-31)
Vilà Brau, Anna (P10-24)
Vilanova Brugués, María (P11e-2)
Vilardell, Jordi (P18-34, P18-53, P18-54)
Vilardell, Josep (P21-7)
Vílchez Rienda, José Dámaso (P21-28)
Vilela, Belmiro (R08-5, P08-14, P08-15)
Villa del Campo, Cristina (R03-3)
Villadangos, Almudena F. (P11r-7, P12-8)
Villalonga, Príam (P01-9, P02-28, P18-52, P18-56)
Villalonga, Ruth (P10-20)
Villanueva, Judith (R08-6)
Villar, Diego (P21-14)
Villar Piqué, Anna (P17r-33)
Villar Portela, Susana (P12-5)
Villarino Marín, Antonio Luis (R09-1)
Villarroel, Álvaro (R05-7, R20-4)
Villarroel Rodríguez, Noelia (P-11)
Villegas, Sandra (P17r-53)
Vilella, G. (P18-1)
Villén, Judit (P18-63)
Villena, Josep A. (R02m-4, P02-2)
Viña, Juan R. (P01r-8, P10r-10)
Vinyoles, Meritxell (P18r-41)
Vizan, Pedro (P02e-38)
Vizoso, Ángel (P21-15, P21-12)
Volkow, Nora (P18r-3)
Wakefield, John (P17r-2)
Walko, Gernot (Pr-16)
Warner, Margaret (P16m-7)
Webb, Paul (P17e-36)
Westerhoff, Hans (P10-8)
White, Robert (S1.2-3)
Wiche, Gerhard (Pr-16)
Wienkoop, Stefanie (R13-7)
Willers, Imke (P10e-2)
Williams, Roderick (R15-5)
Xaubet, Antoni (P-21)
Xi, Qiaoran (P18-66)

- Yardley, Vanessa (P15r-6)
Ye, Junmei (R01-3)
Yenush, Lynne (P12-2, P20r-3)
Yero, Daniel (R12-1)
Ynigo Rivera, María (P15-12)
Yuste, Víctor J. (R01-7)
- Zabala López de Maturana, Aitor (P02-31)
Zabala Otaño, Juan Carlos (P12-1)
Zafra, Francisco (R05-, R14r-7, P14r-2)
Zafrilla Requena, Basilio (P13-10, P13-8)
Zamona, Mónica (P18-26)
- Zaragoza, Rosa (P01r-8, P10r-10)
Zaragoza Martínez, Ana (P05-6)
Zaromytidou, Alexia (P18-66)
Zhang, Xiadong (S2.1-2)
Zhang, Xin (R12m-3)
Zimman, Horacio (P02r-23)
Zomeño, Dolors (P-18)
Zorzano, Antonio (P10m-11, P10m-12, P-8)
Zuluaga, Susana (S2.3-3)
Zurashvili, Tinatin (P18-14)
Zurita, Esther (R02r-5)
Zuwerra, Didier (P17r-2)

