

MEMORIA 1998-99

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
CSIC-UAM.**

**Arturo Duperier, 4
E-28029 Madrid
Tel.: 91-585-4600
Fax: 91-585-4587
internet: <http://www.iib.uam.es>**

INDICE

1. Presentación	5
2. Organigrama del Instituto	7
3. Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer	13
4. Departamento de Bioquímica y Genética de levaduras	39
5. Departamento de Endocrinología Molecular	53
6. Departamento de Enzimología y Patología Molecular	87
7. Departamento de Estructura y Función de Biomoléculas	99
8. Departamento de Regulación de la Expresión Génica	119
9. Departamento de Señalización Celular	145
10. Seminarios celebrados	165
11. Cursos impartidos	175
12. Resumen de Datos Económicos	179
13. Índice alfabético de Jefes de Laboratorio	185
14. Índice alfabético de personas citadas	189
15. Índice alfabético de palabras clave	195
16. Alphabetical listing of Summaries of research topics	199

Presentación

La presente memoria resume la actividad del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" durante el bienio 1998-99. El Instituto es un Centro Mixto Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad Autónoma de Madrid (UAM), que lleva el nombre del Prof. Alberto Sols por su especial relevancia en el origen del Instituto y por su papel esencial en el desarrollo y consolidación de la Bioquímica en España.

El germen del actual IIB fue el Instituto de Enzimología, dirigido por el Prof. Sols, que en 1971 se traslada desde el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) a la recientemente inaugurada Facultad de Medicina de la UAM, para hacerse cargo de la enseñanza de la Bioquímica. Posteriormente, en 1975, se traslada también desde el CIB a la Facultad de Medicina, el Grupo de Endocrinología Experimental dirigido por los Dres Gabriella Morreale y Francisco Escobar del Rey, a locales cedidos por el Departamento de Morfología, dirigido por el Profesor Reinoso Suarez. En 1984 se creó el Instituto de Investigaciones Biomédicas mediante la fusión del Instituto de Enzimología y el Grupo de Endocrinología Experimental. La Universidad Autónoma cedió los terrenos donde se ubica el actual edificio del Instituto, que fue inaugurado en 1991. La vinculación histórica con el Departamento de Bioquímica se refleja y consolida en el Convenio de Centro Mixto firmado el 8 de Septiembre de 1998 entre el CSIC y la UAM. La actual Dirección es el resultado de las primeras elecciones celebradas tras la entrada en vigor del Convenio.

El Personal del Centro lo forman unas 300 personas, de las cuales 52 son Investigadores del CSIC o Profesores del Departamento de Bioquímica de la UAM, 66 son personal de apoyo a la investigación y unos 180 becarios pre y postdoctorales e investigadores contratados. Se han incorporado al Centro como Científicos Titulares los Doctores Piero Crespo y Mario Vallejo, y a finales de 1999 de la Dra. Belén Peral. En el Departamento de Bioquímica, el Prof. Juan José Aragón finalizó su mandato como Director del Departamento de Bioquímica en Septiembre de 1999, resultando elegido el Prof. Antonio Sillero, que actualmente ocupa dicho cargo. La Dra. Carmela Calés fue nombrada Vicedecana de Investigación de la Facultad de Medicina y el Dr. Víctor Calvo obtuvo la plaza de Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular. Del personal de apoyo a la Investigación en plantilla, hemos contado con la incorporación de D. José María Gutiérrez, en el Servicio de Bioinformática, y de D. Miguel Marsá en el de Animalario. Dña. Begoña Medina, Secretaria de Dirección se incorporó a un nuevo destino en la Comunidad de Madrid. Su puesto vacante ha sido cubierto en marzo de 2000 por Dña. Rosario Agüero.

Los recursos generados por el Centro mediante Proyectos y contratos de Investigación son del orden de los 1000 millones de pesetas para el bienio. La producción científica del Centro está recogida en mas de 200 publicaciones y cerca de 40 Tesis Doctorales, además de 4 patentes. La Dra. Gabriella Morreale recibió el Premio Rey Jaime I de Medicina Clínica (1998), el Dr. Juan Carlos Lacal el Premio de la Fundación Dr. Antonio Esteve (1999) y el Dr. Angel Pestaña el Premio Josep Padullés de la Sociedad de Oncología Pediátrica (1999). Desde aquí mi felicitación a los premiados.

Finalmente, mi agradecimiento al Vicedirector, Antonio Coloma, a los miembros de la Junta de Instituto y a los componentes de las distintas comisiones que colaboran con la Dirección y que con su trabajo contribuyen decisivamente al funcionamiento del Centro. En este sentido quiero agradecer especialmente el esfuerzo y el tiempo que el Dr. Jaime Renart ha dedicado a la recogida de datos y la confección de esta memoria.

Juan Bernal Carrasco
Director

Organigrama del Instituto

Director: Juan Bernal
Vicedirector: Antonio Coloma
Gerente: Rafael Alguacil

Departamentos de Investigación:

1. Biología Molecular y Celular del Cáncer

Jefe de Departamento:
Rosario Perona

Investigadores:
Amparo Cano
Juan Carlos Lacal
Angel Pestaña
Antonio Villalobo

Personal de Apoyo a la Investigación:
Amparo Jiménez
Amalia Montes
M^a Angeles Ramos

2. Bioquímica y genética de levaduras

Jefe de Departamento:
M^a Jesús Mazón

Investigadores:
Pilar Eraso
Carlos Gancedo
Rosario Lagunas
Francisco Portillo
Juana M^a Sempere

Personal de Apoyo a la Investigación:
M^a Isabel Bermúdez
Eulalia Morgado
Eulalia Moreno

3. Endocrinología Molecular

Jefe de Departamento:
Pilar Santisteban

Investigadores:
Juan Bernal
Piero Crespo (desde 1999)
Francisco Escobar
Gabriela Morreale
Alberto Muñoz
M^a Jesús Obregón

Mario Vallejo (desde 1999)

Personal de Apoyo a la Investigación:

Gloria Chacón
Socorro Durán
Arturo Hernández
Margarita González
M^a Jesús Presas
M^a Teresa Seisdedos

4. Enzimología y Patología Molecular

Jefe de Departamento:

Antonio Sillero

Investigadores:

Juan José Aragón
Antonio Coloma
Claudio F. de Heredia
M^a Antonia Günther
Pilar Llorente
M^a Rosa Sagarra

Personal de Apoyo a la Investigación:

M^a Luisa Argomaniz
M^a Elena Candel
Isabel de Diego
M^a Asunción Navarro
Valentina Sánchez

5. Estructura y Función de Biomoléculas

Jefe de Departamento:

M^a Angeles Pajares (hasta 1998)
Francisco Vara

Investigadores:

Susana Alemany
Carmela Calés
Sebastián Cerdán
Margarita Fernández
José G. Castaño
Jorge Martín Pérez

Personal de Apoyo a la Investigación:

Carmen Domínguez
Francisco Jesús Garrido
Joaquín Oliva

6. Regulación de la expresión génica

Jefe de Departamento:

Leandro Sastre (hasta 1998)
Margarita Cervera

Investigadores:

Ana Aranda
Jesús Cruces
Carmen García Vallejo
Rafael Garesse
Roberto Marco
Angel Pascual
Ana M^a Pérez Castillo

Personal de Apoyo a la Investigación:

Jorge Martínez (hasta julio 1998)
Pilar Ochoa
Ana M^a Seguido
Aida Villa

7. Señalización Celular

Jefe de Departamento:

Isabel Varela (hasta 1998)
Jaime Renart

Investigadores:

Antonio Cuadrado
Juan Emilio Felú
Miguel Quintanilla
M^a Angeles Rodríguez Peña

Personal de Apoyo a la Investigación:

M^a Carmen Moratilla

Servicios de Gestión y Administración

Responsable:

Rafael Alguacil

Administración:

Rafael Alguacil
Rosa Monteserín
M^a Carmen Moreno
Jesús Rodríguez
Manuela Mingot

Almacén:

Mariano Garrido
José Vicente Ruiz-Peinado

Biblioteca:

M^a Paz Langa

Correspondencia:

Manuel Gallardo

Secretaría de Dirección:

Begoña Medina (hasta 1999)
M^a Carmen Moreno (en funciones)

Recepción y telefonía:
Juana de la Rosa
Gabriel Barón

Servicios Técnicos:

Animalario:
Fernando Nuñez
Pablo Señor
Miguel Marsa

Cultivo de Células y Preparación de medios:
Ana Gutiérrez
M^a Rosa Arregui
M^a Carmen Luengo
Gemma Luengo

Dibujo y Delineación:
Javier Pérez

Fotografía:
Antonio Fernández
Ricardo Uña

Informática:
Javier Merino
José M^a Gutiérrez

Lavado de Material:
Silvia Cuenca
Manuela Rodríguez-Barbi
Adela Ruiz-Peinado

Mantenimiento:
Roberto López
Angel García
Ramón Navares
Rafael Vara

Radioprotección:
M^a Teresa Macías
Raquel Pina

Secuenciación:
Gemma Rodríguez-Tarduchy
Concepción Santiago

Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Regulación de la expresión de cadherina E, de la funcionalidad de los complejos cadherina E/cateninas y de la señalización de β -catenina en la progresión tumoral

Investigador Principal:	Cano, Amparo, Profesora Titular UAM
Investigadores Asociados:	Quintanilla, Miguel, Colaborador Científico, CSIC, IIB
Personal de Apoyo	Montes, Amalia (auxiliar CSIC) Olmeda, David (técnico CAM, Enero-Diciembre 1998) Peinado, Héctor (técnico CAM, desde Noviembre 1999)
Becarios Postdoctorales:	Rodrigo, Isabel (hasta Septiembre 1998) Pérez, Mirna Alicia (desde Julio 1999)
Becarios Predoctorales:	Espada, Jesús Pérez, Mirna Alicia (hasta Mayo 1999) Olmeda, David (desde Enero 1999)
Colaboraciones:	Portillo, Francisco, Prof. Titular UAM, IIB. Nieto, Angela; (Colaborador Científico. CSIC. Instituto Cajal. Madrid). Fabra, Angels (Jefe de Departamento, Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynals, Barcelona). Gamallo, Carlos (Prof. Titular, UAM, Dpto. Anatomía Patológica; Hospital La Princesa, Madrid). Palacios, José (FEA, Dpto. Anatomía Patológica. Hospital La Paz, Madrid). Ramón y Cajal, Santiago (FEA, Dpto. Anatomía Patológica. Hospital Puerta de Hierro, Madrid). Braga, Vania M. M. (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, London, U.K.). Rodríguez-Viciano, Pablo (UCSF Cancer Research Institute, San Francisco, CA, USA). González-Mariscal, Lorenza (Profesora Titular. CINVESTAV, México D.F. México).

Palabras Clave

Cadherina E, β -catenina, H-ras, Snail, invasión tumoral

Regulación de la expresión de cadherina E en la progresión tumoral. Identificación de factores de transcripción que interaccionan con el elemento E-pal: Papel represor del factor Snail

(I. Rodrigo, M. A. Pérez, H. Peinado, A. Montes, F. Portillo, A. Nieto, A. Cano)

La cadherina E (CD-E) está considerada una molécula antiinvasiva de carcinomas, estando su pérdida implicada en la adquisición del fenotipo tumoral invasivo, proceso frecuentemente acompañado de transiciones epitelio-mesénquima. La caracterización de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de CD-E son de vital importancia para avanzar en el conocimiento del proceso invasivo y en la búsqueda de nuevas terapias anti-tumorales. Nuestros estudios previos sobre la regulación de la transcripción del gen de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón mostraron que la expresión del gen CD-E, está regulada por una combinación de factores activadores que actúan sobre el promotor basal (región GC y caja CCAAT) y de factores inhibidores que interaccionan con un elemento palindrómico, E-pal, (localizado en la

posición -90 a -70) y con una región adyacente, denominada CE (-108 a -86), que contiene un sitio de reconocimiento para factores de la familia Ets. Los estudios del promotor endógeno de cadherina E en diferentes líneas celulares (footprinting in vivo, metilación, etc.) han puesto de manifiesto que en células CD-E (+) el promotor presenta una conformación "abierta" con múltiples sitios de interacción en la regiones reguladoras caracterizadas in vitro, mientras que en células CD-E (-) la interacción con factores de transcripción se limita al elemento E-pal y al sitio Ets. Estos resultados, junto a los de actividad transcripcional de diferentes construcciones del promotor en células CD-E (+) y CD-E (-) nos han llevado a plantear un modelo según el cual en las células deficientes en CD-E el elemento E-pal, y los factores con los que interacciona, ejerce un papel represor predominante impidiendo la interacción de los factores estimuladores con los elementos proximales. La caracterización de los factores que interaccionan con el elemento E-pal se ha llevado a cabo utilizando la aproximación del híbrido sencillo de levadura que ha permitido identificar tres factores de transcripción que interaccionan específicamente con el elemento E-pal en su versión salvaje. Uno de los factores identificado (representado en el 49% de los clones aislados) corresponde al factor de la familia de dedos de zinc Snail. Miembros de esta familia habían sido previamente implicados, por la Dra. A. Nieto, en la transición epitelio-mesénquima que ocurre durante el desarrollo embrionario temprano. Los estudios de cotransfección transitoria han mostrado que Snail es un potente represor de la actividad del promotor de CD-E, reduciendo la expresión del promotor proximal al 75-90% en diferentes células epiteliales. Adicionalmente, la expresión ectópica de Snail en células epiteliales induce una dramática conversión hacia un fenotipo fibroblastoide, concomitante con la pérdida de expresión de CD-E y la adquisición de propiedades invasivas y tumorigénicas. El análisis de la expresión endógena de Snail en una colección de líneas de carcinomas murinos y humanos ha mostrado que Snail se expresa en aquellas líneas que han perdido la expresión de CD-E y tienen propiedades invasivas y metastáticas. La correlación inversa entre la expresión de CD-E y Snail también se ha observado en una muestra inicial de tumores murinos y humanos. Estos resultados indican que Snail induce la transición epitelio-mesénquima que ocurre durante la invasión tumoral a través de la represión de la expresión de CD-E y permiten plantear a Snail como un marcador de invasión tumoral a la vez que abren nuevas perspectivas para el diseño de agentes anti-invasivos. Actualmente se está procediendo a la caracterización del mecanismo de represión ejercido por Snail sobre el promotor de CD-E y su comparación con otros miembros de la familia, como Slug, así como a la generación de anticuerpos anti-Snail que permitan un análisis detallado en muestras amplias de tumores humanos. Asimismo, se está procediendo a la caracterización funcional de los otros factores de transcripción que interaccionan con el elemento E-pal identificados en el sistema del híbrido sencillo. Esta misma aproximación se utilizará en el futuro próximo para identificar los factores que interaccionan con la región reguladora CE.

Modulación de los complejos cadherina-E/cateninas y señalización de β -catenina en la progresión tumoral. Efecto de H-ras.

(J. Espada, D. Olmeda, V. M. M., Braga, P. Rodríguez-Viciano, A. Cano)

La actividad funcional de la cadherina E depende estrictamente de la interacción del dominio citoplásmico de la molécula con el citoesqueleto de actina, lo que está mediado por la asociación con una serie de proteínas citoplásmicas, denominadas cateninas: α -, β -, γ -catenina (esta última idéntica a plakoglobina). Adicionalmente, β -catenina (y plakoglobina) citoplásmica es un efector de la vía de señalización de Wnt, teniendo la capacidad de translocarse al núcleo y de interaccionar con factores de transcripción de la familia Lef-1/TCF en respuesta a esta señal. La regulación de los niveles citoplásmicos y de la estabilidad metabólica de β -catenina juegan un papel esencial en esta vía de señalización, y dependen de la fosforilación de β -catenina en residuos Ser/Thr por la quinasa GSK-3 β , así como de su interacción en un complejo multiproteico donde participan la proteína supresora de tumores APC y la propia GSK-3 β . En ausencia de señal, la formación de este complejo promueve la degradación proteolítica de β -catenina citoplásmica por la vía del proteasoma, mientras que en presencia de Wnt se inhibe la actividad de GSK-3 β , impidiéndose la fosforilación de β -catenina, la formación del complejo multiproteico y se promueve la estabilización metabólica de β -catenina y su translocación

nuclear subsiguiente. De manera similar, mutaciones en APC o en β -catenina que impiden la formación de este complejo se traducen en la estabilización y translocación nuclear de β -catenina, por lo que se ha propuesto que β -catenina se puede considerar como un oncogén. En este contexto, nuestro interés se ha centrado en analizar la relación entre los niveles de β -catenina asociada a complejos de adhesión y β -catenina citoplásmica/nuclear durante la progresión tumoral y la modulación de este equilibrio por la activación de oncogenes como H-ras. En la carcinogénesis de piel de ratón la activación oncogénica de H-ras es uno de los primeros eventos mutacionales, acumulándose otras alteraciones en el locus de H-ras que llevan a un incremento de la dosis del alelo H-ras mutado durante la progresión tumoral. Utilizando una línea de queratinocitos epidérmicos murinos inmortalizada (Pam212) se ha analizado el efecto de la sobreexpresión de una forma de H-ras oncogénico (V12H-ras) sobre los complejos CD-E/cateninas y señalización de β -catenina. Mediante una combinación de técnicas de microinyección y de expresión estable de V12H-ras se ha puesto de manifiesto que H-ras oncogénico induce la desorganización de los complejos de adhesión en los contactos célula-célula y la relocalización citoplásmica de β -catenina. Estos efectos inducidos por V12H-ras se acompañan de la pérdida de interacción β -catenina/APC, de una significativa disminución de los niveles de β -catenina fosforilada en Ser y de la estabilización metabólica de β -catenina, de forma independiente de la actividad GSK-3 β . Sin embargo, los efectos de V12H-Ras dependen de la actividad de su efector fosfoinositol-3-OH-quinasa (PI3K), habiéndose detectado la existencia de un complejo β -catenina/PI3K que se encuentra significativamente incrementado en las células que sobreexpresan V12H-ras. De hecho, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de PI3K (p110 α -CAAX) es suficiente para bloquear la interacción β -catenina/APC y para promover la estabilización metabólica de β -catenina y su translocación nuclear. Estos resultados indican que la activación oncogénica de H-ras induce la capacidad señalizadora de β -catenina, por una vía independiente de Wnt/ GSK-3 β y en la que participa una quinasa, todavía no identificada, y el efector de H-ras, PI3K. Actualmente, se está investigando el mecanismo específico de participación de PI3K, así como procediendo a la caracterización de la quinasa(s) implicada en la regulación de la estabilidad de β -catenina citoplásmica en este sistema.

Por otra parte, los estudios realizados sobre los complejos CD-E/cateninas y localización de β -catenina/plakoglobina en diferentes líneas celulares de queratinocitos con diferentes niveles de H-ras oncogénico sugieren un nivel adicional de regulación de la señalización mediada por estas moléculas a nivel de su translocación nuclear. En relación con este aspecto, se está analizando el mecanismo de importe/exporte nuclear de estas moléculas para lo que se ha puesto a punto un ensayo de transporte nuclear en células permeabilizadas y se han generado diferentes construcciones de ambas proteínas fusionadas a GFP.

Papel de la CD-E y la señalización de β -catenina/plakoglobina en la invasión y la metástasis y su relación con proteasas de matriz extracelular.

(D. Olmeda, A. Montes, A. Fabra, A. Cano)

Basándonos en nuestros estudios previos acerca de la relación entre la capacidad invasiva/metastásica inducida por la pérdida de CD-E y asociada a la expresión de la metaloproteinasa MMP-9, se está procediendo a caracterizar el mecanismo molecular subyacente. Para ello disponemos de un sistema constituido por una línea celular derivada de un carcinoma epidermoide, HaCa4 (CD-E-), y una serie de clones obtenidos tras la transfección con el cDNA de CD-E (E62, E24) o la transfección de cDNA antisentido de CD-E en la línea E24 (CD-E+). Adicionalmente, se han generado una serie de subclones a partir de la línea E62 con diferente capacidad metastásica. El estudio de la distribución celular de β -catenina/plakoglobina en las diferentes líneas ha mostrado un incremento de los niveles citoplásmicos de ambas proteínas en los clones con elevada capacidad metastásica, en algunos casos asociado a una fuerte localización perinuclear, y altos niveles de expresión/actividad de MMP-9. Actualmente, se está procediendo al análisis de la posible modulación de la transcripción del gen de MMP-9 por

β -catenina/plakoglobina, ya que se ha detectado la existencia de sitios de reconocimiento para factores Lef-1/ TCF en el promotor proximal de MMP-9.

Análisis de la unión estrecha durante la progresión tumoral. Efecto de H-ras.

(Mirna A. Pérez, L. González-Mariscal, A. Cano)

La unión estrecha es el sistema de adhesión intercelular que en las células epiteliales regula, entre otros aspectos, la polaridad celular y permeabilidad paracelular. Su organización funcional está mediada por proteínas transmembrana específicas (occludina, claudinas) asociadas a una serie de proteínas citoplásmicas (ZO-1, ZO-2, ZO-3) y al citoesqueleto de actina, y depende estrictamente de la existencia de uniones adherentes funcionales mediadas por los complejos cadherina E/cateninas. En este contexto, se ha iniciado el estudio de la organización estructural y funcional de la unión estrecha en relación con la progresión tumoral, utilizando el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. Se está procediendo a analizar la expresión de los diferentes componentes de este sistema de adhesión y de su organización en función de la activación del oncogen H-ras en queratinocitos murinos.

Expresión de CD-E y cateninas en carcinomas de mama y su relación con otros marcadores clínico-patológicos.

(J. Palacios, C. Gamallo, A. Cano)

Basado en nuestros estudios previos sobre la expresión de CD-E en carcinomas de mama que mostraron la pérdida de expresión de CD-E en relación con el tipo histológico y grado de diferenciación, se está procediendo al estudio detallado de la expresión de plakoglobina y otras cateninas (α -catenina, β -catenina, p120cas) en relación con la expresión de APC y otros marcadores establecidos de progresión tumoral (receptores de estrógenos y progesterona, p53, c-erbB2, etc.) en una muestra de 300 tumores de mama. Los resultados iniciales indican una mayor frecuencia de alteraciones en la expresión/organización de plakoglobina en función de la expresión de CD-E que serán analizados en relación con los otros parámetros y el grado de supervivencia.

Estudio del gen E1A de adenovirus como supresor tumoral

(A. Cano, M. Quintanilla, S. Ramón y Cajal)

Siguiendo la colaboración establecida en años anteriores con el grupo del Dr. S. Ramón y Cajal se está analizando la capacidad anti-tumoral del gen E1A de adenovirus, en sus versiones 12S y 13S, en diferentes líneas de carcinomas murinos y humanos. Asimismo, se prosigue el análisis sobre la capacidad de inducir quimio- y/o radio-resistencia por estas versiones de E1A tanto en sistemas celulares en cultivo como in vivo en tumores inducidos en ratones inmunodeprimidos por diferentes líneas de carcinoma.

Publicaciones

Lozano, E. and Cano, A. (1998) Coexpression of plakoglobin and E-cadherin in mouse spindle carcinoma cells induces a mutual stabilization and a retardation of tumor growth latency. *Mol. Carcinog.*, 21: 273-287.

Llorens, A., Rodrigo, I., López-Barcons, Ll., González-Garrigues, M., Lozano, E, Vinyals, A., Quintanilla, M., Cano, A. and Fabra, A. (1998) Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to Matrix Metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.*, 78, 1131-1142.

- Sánchez-Prieto, R., Quintanilla, M., Martín, P., Leonart, M., Cano, A., Dotto, G.P. and Ramón y Cajal, S. (1998) *In vivo* antitumor suppressor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1A gene. *Cancer Gene Ther.*, 5, 215-224.
- Lozano, E. and Cano, A. (1998) Cadherin/catenin complexes in murine epidermal keratinocytes: E-cadherin complexes containing either β -catenin or plakoglobin contribute to stable cell-cell contacts. *Cell Adh. Commun.*, 6, 51-67.
- Sánchez-Prieto, R., Quintanilla, M., Cano, A., Leonart, M., Martín, P. and Ramón y Cajal, S. (1998) *In vivo* tumor suppressor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1A gene. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 451, 79-86.
- Cano, A. (1998) Bases moleculares de la invasión y la metástasis. *Oncología*, 21, 40-45.
- Rodrigo, I., Cato, A. A. and Cano, A. (1999) Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.*, 248, 358-371.
- Espada, J., Pérez-Moreno, M., Braga, V.M.M., Rodríguez-Viciano, P. and Cano, A. (1999) H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of β -catenin in epidermal keratinocytes. *J. Cell Biol.*, 146, 967-980.
- Cachón-González, B., SanJosé, I., Cano, A., Vega, J.A., García, N., Freeman, T., Schimmang, T. and Stoye, J.P. (1999) Molecular and morphological characterization of mutations at the *hairless* gene of the mouse. *Dev. Dyn.* 216, 113-126.
- Martín-Duque, P., Sánchez-Prieto, R., Romero, J., Martínez-Lamparero, A., Cebrián-Sagarriga, S., Guinea-Vinegra, J., Domínguez, C., Leonart, M., Cano, A., Quintanilla, M. and Ramón y Cajal, S. (1999) *In vivo* radiosensitizing effect of the adenovirus E1A gene in murine and human malignant tumors. *Int. J. Oncol.*, 15, 1163-1168.
- Martín-Duque, P., Alonso, C., Sánchez-Prieto, R., Leonart, M., Martínez, C., González de Buitrago, G., Cano, A., Quintanilla, M. and Ramón y Cajal, S. (1999) Adenovirus lacking the 19K- and 55K-E1B genes exert a marked cytotoxic effect in human malignant cells. *Cancer Gene Ther.*, 6, 554-563.

Patentes

- Cano, A., Pérez, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., del Barrio, M.G., Blanco, M.J., Portillo, F. y Nieto, M.A. (fecha de presentación 01 Julio 1999) Snail, nuevo marcador de progresión tumoral y proteína diana de nuevos compuestos antitumorales. SOLICITANTES: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Autónoma de Madrid. NÚMERO DE SOLICITUD: 9901466

Tesis doctorales

Isabel Rodrigo Castro

"Regulación de la expresión y función de la molécula de adhesión celular cadherina E durante la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 1998. Directora: Amparo Cano García. Calificación: Apto cum laude por unanimidad.

Jesús Espada Regalado

"Modulación del complejo de adhesión cadherinaE/cateninas y de la estabilidad metabólica de la β -catenina por el oncogén H-ras y su efector PI3K". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Directora: Amparo Cano García. Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad.

Mecanismos de transmisión de señales alterados tras la transformación celular por oncogenes de la superfamilia Ras

Investigador Principal:	Lacal Sanjuán, Juan Carlos, Investigador Científico
Becarios Postdoctorales:	Montaner Salas, Silvia (hasta junio-1998) Hernández Alcoceba, Rubén (hasta junio-1998) Fernández Valerón, Pilar (hasta septiembre-1999) Obregón Calderón, Patricia (junio 1998 - junio 1999) Embade Urrutia, Nieves (hasta diciembre-1999) López Collazo, Eduardo (desde septiembre-1999)
Becarios Predoctorales:	Saniger Bernal, Luisa (hasta diciembre 1998) Gallego Gómez, Juan Carlos (hasta abril 1999) Lucas Parras, Luisa Fernández Martínez, Félix Rodríguez González, Agustín (desde septiembre 1998) Ramírez de Molina, Ana (desde septiembre 1998) Penalva Ambrona, Verónica (desde septiembre 1998) Aznar Benitah, Salvador (desde junio 1998) Del Rincón, Sonia (estudiante Canadá, enero-junio-1999)
Colaboraciones:	Perona Abellón, Rosario, IIB Espinosa Ubeda, Antonio. Univ. Granada Martín Sánchez-Cantalejo, Yolanda. Univ. Europea de Madrid Fernández Braña, Miguel. Univ. San Pablo-CEU
Personal de Apoyo	Ramos García, M. Angeles

Palabras Clave

Ras GTPasas, Oncogenes, Transmisión de señales, Antitumorales, Apoptosis, Factores de transcripción

Mecanismos de transmisión de señales proliferativas.

(L. Lucas, V. Penalva, A. Ramírez, J.C. Lacal)

Las rutas de señalización intracelulares utilizadas en células normales estimuladas por factores de crecimiento y sus alteraciones en células transformadas por oncogenes, están relacionadas con el metabolismo fosfolipídico. Hemos encontrado como resultados más destacados:

La mayoría de los factores de crecimiento y ciertos oncogenes utilizan la ruta de degradación de fosfatidilcolina (PC) como parte importante del mecanismo de regulación de la proliferación celular en fibroblastos.

El mecanismo de señalización implica a una fosfolipasa D específica para PC, con la generación de colina y ácido fosfatídico (PA), seguida de la producción de fosforilcolina (*PCho*) y diacilglicerol (DAG), mediante la actividad de colina quinasa y PA-fosfatasa respectivamente.

La *PCho* generada juega un papel esencial en la transmisión de la señal mitogénica, puesto que inhibidores de la actividad colina quinasa suprimen la capacidad proliferativa de células tratadas con factores de crecimiento. Sin embargo, la respuesta mitogénica se recupera en presencia de factores de progresión como insulina, o mediante la adición de *PCho*.

Actualmente estamos profundizando en el estudio de los mecanismos de regulación de esta cascada tanto en condiciones normales o fisiológicas como en condiciones patológicas tras la transformación por oncogenes.

Regulación de la apoptosis por genes *rho*.

(P. Fernández, E. López-Collazo, J.C. Lacal)

Hemos descubierto que los genes de la familia *rho*, además de poseer actividad oncogénica, son potentes inductores de la muerte celular programada (apoptosis) en diversos sistemas celulares. Hemos identificado algunas de las rutas de transmisión de señales intracelulares que pueden estar conectadas con esta actividad. Por una parte, la inducción de la apoptosis requiere dos señales complementarias, competencia y progresión. Nuestros resultados demuestran que diversos miembros de la familia de GTPasas Rho son capaces de inducir apoptosis mediante un mecanismo que involucra la generación de ceramidas junto con señales complementarias, constituyendo la generación de ceramidas la señal de progresión. Estos resultados constituyen de hecho la primera demostración bioquímica del requerimiento de dos señales para la inducción de la apoptosis, de forma semejante al requerimiento de dos señales complementarias en la inducción de la proliferación con la participación de factores de competencia y de progresión. En el caso de Rac1, la señal complementaria es la síntesis *de novo* de FasL. En estas condiciones, la producción de FasL depende a su vez de señales generadas por la rutas de JNK y la de NK-kB, rutas que confluyen en la regulación del promotor de FasL.

Señalización intracelular mediada por proteínas Rho

(S. Aznar, E. López-Collazo, R. Perona, J.C. Lacal)

Las proteínas Rho han demostrado ser versátiles moduladores de un número significativo de cascadas de señalización intracelulares. Además de una serie de quinasas de la familia de Ser/Thr como JNK y p38-SAPK, se han identificado quinasas con cierta homología a la familia de PKC como son la PKN, ROK, rhotekina, etc. Como resultado de la conexión de estas cascadas, se produce la activación de factores de transcripción tan diversos como AP-1, SRF y NF-kB. Nuestros estudios se han focalizado en la identificación de rutas de señalización activadas por diferentes miembros de la familia de Rho GTPasas y su relación con la activación de factores de transcripción específicos.

Nuestros resultados han demostrado que las proteínas Rho activan eficientemente el factor de transcripción nuclear kB. Además, hemos demostrado que la activación de SRF se produce por al menos dos mecanismos alternativos. Mientras que las proteínas Rho utilizan al factor NF-kB, conjuntamente con c/EBPb, las proteínas Rac1 y CDC42 utilizan un mecanismo independiente de NF-kB pero dependiente de MEKK-1. Nuestros estudios están enfocados en la actualidad en la búsqueda de otros factores de transcripción regulados por proteínas Rho.

Desarrollo de nuevos agentes antitumorales

(A. Rodríguez, F. Fernández, A. Espinosa, Y. Martín, M. Fernández-Braña, J.C. Lacal)

Nuestros estudios previos han demostrado que células transformadas por oncogenes de la familia *ras* y otros que participan en la regulación de cascadas de señalización mitogénica (*src*, *raf*, *mos*, etc.) presentan niveles elevados de *PCho* debidos a un aumento en la actividad de la colina quinasa (ChoK). Este aumento de *PCho* parece ser relevante para el proceso de transformación celular. Estos resultados sugieren que la *PCho* constituye un segundo mensajero esencial en la regulación de la proliferación celular y que forma parte intrínseca del mecanismo de transformación por oncogenes. En estudios complementarios, hemos desarrollado un programa de diseño y síntesis de inhibidores de la ChoK como posibles nuevos antitumorales.

En colaboración con varios grupos de química orgánica y farmacéutica, hemos diseñado la síntesis de nuevos agentes antitumorales basados en nuestro descubrimiento de un papel relevante de la ruta PLD/ChoK en la transmisión de señales mitogénicas. Los resultados obtenidos ratifican totalmente la hipótesis de que la generación de *PCho* se realiza mediante la

activación de la ruta PLD/ChoK y que la producción de *PCho* es esencial para la actividad mitogénica de factores de crecimiento y oncogenes, además de permitirnos ratificar el potencial de actividad antitumoral de los fármacos de diseño que bloquean esta ruta. Los resultados más recientes de nuestro grupo muestran que los inhibidores de la ChoK tienen capacidad inhibitoria de la proliferación celular y además actividad antitumoral en ratones desnudos inoculados con tumores de origen humano. Los estudios actuales están orientados hacia la caracterización de la actividad antitumoral en un amplio espectro de líneas tumorales de los compuestos diseñados y sintetizados por nuestro grupo y con resultados preliminares positivos.

Publicaciones

- Carnero, A., and Lacal, J.C. (1998). Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-, MAPK-dependent pathway. *FEBS Lett.* 422, 155-159.
- Montaner S., Perona R., Saniger L., and Lacal J.C. (1998) Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor κ B by the Rho family of GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 12779-12785.
- Esteve P., Embade N., Perona R., Jiménez B., León J., del Peso L., Arends M., Bustelo X., Miki T., and Lacal J.C. (1998). Rho-regulated signals induce apoptosis *in vitro* and *in vivo* by a p53-independent, but Bcl2-dependent pathway. *Oncogene.* 17, 1855-1869.
- Lacal, J.C. (1998). *Xenopus laevis* oocytes as a model for the study of signalling cascades. *Methods in Molecular Biology* 84, 139-152.
- Lacal J.C. (1998). Bases moleculares del cáncer: oncogenes y genes supresores. *Oncología* 21, 26-32.
- Montaner S., Perona R., Saniger L. and Lacal, J.C. (1999) Activation of the serum Response Factor (SRF) by Rho A is mediated by the activity of NF- κ B and c/EBP families of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 274, 8506-8515.
- Hernández-Alcoceba R., Fernández F. and Lacal J.C. (1999). A novel mechanism for anticancer drug discovery: *In vivo* antitumor activity by inhibition of phosphorylcholine production. *Cancer Research* 59, 3112-3118.
- Lacal J.C., Perona, R. and Feramisco J. (1999). Microinjection. *Methods and Tools in Biosciences and Medicine.* Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Feramisco J., Perona R. and Lacal J.C. (1999). Needle Microinjection: A Brief History. En "Microinjection. Methods and Tools in Biosciences and Medicine" pg 9-15. Lacal J.C., Perona R. and Feramisco J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Perona R., Dolfi F., Feramisco J., and Lacal J.C. (1999). Microinjection of macromolecules into mammalian cells in culture. En "Microinjection. Methods and Tools in Biosciences and Medicine" pg 16-30. Lacal J.C., Perona R. and Feramisco J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Lacal J.C. (1999). Microinjection of *Xenopus laevis* oocytes: a model system. En "Microinjection. Methods and Tools in Biosciences and Medicine" pg 134-145. Lacal J.C., Perona R. and Feramisco J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Carnero A, and Lacal J.C. (1999) *Xenopus laevis* oocytes as a model for studying the activation on intracellular kinases. En "Microinjection. Methods and Tools in Biosciences and Medicine" pg 147-160. Lacal J.C., Perona R. and Feramisco J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Carnero A, and Lacal J.C. (1999) Signal transduction in *Xenopus laevis* oocytes by Ras oncoproteins and lipid metabolites. En “Microinjection. Methods and Tools in Biosciences and Medicine” pg 161-173. Lacal J.C., Perona R. and Feramisco J. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Lacal, J.C. (1999). Oncogenes y Genes Supresores. En “Tratado de Oncología Médica”. H. Cortés-Funes, E. Díaz-Rubio, J. GARCÍA-Conde, J.R. Germá, V. Guillén, J.J. López, J.A. Moreno Nogueria, G. Pérez Manga (eds.). Nova Disonia S.L.. Madrid.

Perona R., Lacal J.C. (1999). Transmisión de señales. En “Tratado de Oncología Médica”. H. Cortés-Funes, E. Díaz-Rubio, J. GARCÍA-Conde, J.R. Germá, V. Guillén, J.J. López, J.A. Moreno Nogueria, G. Pérez Manga (eds.). Nova Sidonia S.L.. Madrid.

Lacal, J.C. (1999). Diagnóstico precoz del cáncer: aspectos moleculares. JANO, Medicina y Humanidades.

Lucas, L., Lacal J.C. (1999). Efectores moleculares de las proteínas Ras. Revisiones en Cáncer 13, 16-26.

Patentes.

Patente NACIONAL: Sistema de identificación (“screening”) de compuestos con actividad antitumoral, antiviral, antiparasitaria y antifúngica.

Organismos: CSIC Patente N° P9801828

Inventor: Juan Carlos Lacal

Patente INTERNACIONAL. PCT/ES99/00275

Premios

Premio de Investigación Fundación Dr. Antonio Esteve. 1999.

Tesis doctorales

Ruben Hernández Alcoceba

Inhibición del enzima colina quinasa como estrategia para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.1998. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Apto (Sobresaliente) cum laude.

Luisa Saniger Bernal

La activación del factor de respuesta a suero inducida por RhoA está mediada por la actividad de los factores de transcripción NF-kB y c/EBPb. 1998. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Sobresaliente cum laude.

Mecanismos de resistencia y muerte celular inducidos por cisplatino

Investigador Principal:	Perona Abellón, Rosario. Científico Titular.
Becarios Postdoctorales:	Sánchez Pérez Isabel (Desde Diciembre 1998)
Becarios Predoctorales:	Guerra Gómez, Javier Gómez García Lourdes (Hasta Noviembre 1998) Saniger Bernal Luisa (Hasta Diciembre 1998) Martínez Gomariz, Monsterrat (desde Septiembre 1998) Madrid Pérez, Olga (febrero -Diciembre 1999) Varea Román, Silvia (enero 98-julio99)
Alumnos Licenciatura:	Díaz Triviño Sara (desde Septiembre 1999)
Colaboraciones:	Lacal Sanjuan, Juan Carlos. IIB Keyse, Stephen. ICRF. UK Martínez Piñeiro, Luis. Hosp. La Paz

Palabras Clave

Cisplatino, apoptosis, resistencia a drogas, JNK, CL100, PSA, cancer próstata

El cisplatino es una droga frecuentemente utilizada en la quimioterapia del cáncer. Como todas las drogas utilizadas para este fin uno de los problemas que involucra su uso es la aparición de poblaciones celulares resistentes al fármaco y que son responsables de un número considerable de fallos en los tratamientos del cáncer. La resistencia a cisplatino puede deberse a alteraciones de diferentes procesos tales como el transporte del fármaco tanto al citoplasma como al núcleo, la reparación del DNA o fallos en el proceso de apoptosis. En nuestro grupo hemos abordado este problema desde dos perspectivas diferentes: por una parte estudiando las rutas de transducción de señales activadas por cisplatino que están involucradas en el proceso de apoptosis y en segundo lugar aislando genes de sensibilidad a cisplatino mediante el uso de librerías de expresión de elementos supresores génicos humanos.

Rutas de transducción de señales activadas por cisplatino relacionadas con apoptosis. En primer lugar hemos estudiado la activación de quinasas intracelulares de la familia MAP quinasa entre las cuales se encuentran las quinasas reguladas por agentes externos (ERK) y las quinasas reguladas por estrés (JNK y p38). Estas enzimas pueden ser activadas en respuesta a diversas señales tanto de naturaleza mitogénica como de estrés celular. Mientras que, tras la exposición a cisplatino, la quinasa de c-jun (JNK) se activa de forma rápida y transitoria, la activación por cisplatino es lenta y persistente. No encontramos diferencias en la activación de ERK's por ambos estímulos. La proteína JNK se activa en respuesta a luz UV y se transloca a núcleo. Nuestros resultados indican que a diferencia de lo que ocurre con luz UV, la activación por cisplatino ocurre en ambos compartimentos celulares con igual cinética. El efecto diferencial ejercido por cisplatino en la activación de JNK parece ser el responsable de la regulación de la muerte celular.

La actividad de las MAPKs se puede regular por defosforilación en residuos críticos para su activación, y es llevada a cabo por proteínas con actividad dual específica para MAPKs, denominadas MKPs, (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase). Los genes descritos en mamíferos incluyen CL100/MKP-1, Pac 1, hVH5, Pyst1, entre otros.. Comprobamos que el pretratamiento con un compuesto inhibidor de tirosina fosfatasa el ortovanadato, prolonga el tiempo de inducción de JNK en respuesta a ambos isómeros de platino, y esto se relaciona con una disminución de la IC₅₀ de 10 veces indicando que alguna actividad fosfatasa de residuos de tirosina está participando en la respuesta a ambos compuestos. Hemos comprobado que la sobreexpresión de los genes CL100 y h-VH-5 es capaz de inhibir la activación de JNK y p38

por cisplatino y esto implica también un aumento en la supervivencia en respuesta a este fármaco. Por el contrario la expresión de la fosfatasa específica de ERK, Pyst-1 no tiene efecto sobre la activación de las dos quinasas ni en la inducción de muerte celular. Los resultados indican que la actividad de determinadas MAPK fosfatasas puede estar implicada en la regulación de muerte celular en respuesta a agentes quimioterápicos. Hemos encontrado que la expresión del gen CL100 con la mutación C258A es capaz de actuar como dominante negativo de la fosfatasa CL100, Las células que expresan este gen mueren a dosis 100 veces menores de cisplatino y transplatino. Estos resultados indican que las fosfatasas de MAPK son una buena diana en la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos en la terapia con cisplatino.

Aislamiento de genes de sensibilidad a cisplatino mediante el uso de librerías de expresión de elementos supresores génicos.

Se designan como elementos supresores genéticos (GSE) a aquellos fragmentos genéticos de pequeño tamaño que funcionan en dirección sentido o antisentido y que producen un fenotipo seleccionable al expresarse en una célula, debido a la inactivación de la función biológica de alguna proteína normal. Ambos tipos de GSE (sentido o antisentido) se pueden obtener por fragmentación al azar del DNA del gen o complejo genético involucrado en el fenotipo deseado. El estudio de genes involucrados en sensibilidad a cisplatino lo hemos abordado mediante la generación de una librería normalizada de expresión de elementos supresores genéticos. Esta librería se ha utilizado para aislar líneas celulares resistentes a cisplatino de las cuales hemos aislado los GSEs. Hemos obtenido varias secuencias de DNA, algunas de ellas corresponden a proteínas que se unen al DNA y que posiblemente estén involucradas en mecanismos de reparación del DNA en respuesta a cisplatino. Actualmente estamos procediendo al clonaje de los genes completos y al estudio de la función de las proteínas en respuesta a cisplatino y otros agentes quimioterápicos.

Detección de PSA en sangre y ganglios pelvianos mediante RT-PCR como medida de micrometastasis de cáncer de próstata. Posible papel como factor pronóstico.

En nuestro laboratorio estamos utilizando la técnica de RT-PCR para detectar en células metastásicas circulantes prostáticas y en ganglios pelvianos el mRNA de antígeno prostático (PSA). Para ello se ha utilizado sangre proveniente de pacientes sometidos a prostatectomía radical en los cuales se trata de determinar la subpoblación de pacientes con cáncer prostático localizado que tengan células tumorales circulantes en el momento del diagnóstico y determinar que maniobras diagnósticas y terapéuticas desencadenan una suelta de células tumorales en el torrente circulatorio. Por otro lado el estudio de la presencia de mRNA de PSA en ganglios pelvianos nos servirá para determinar si este es un mejor método para detectar las metástasis cercanas con mayor eficiencia que con los métodos tradicionales de inmunohistoquímica y esto permitirá por tanto una mejor decisión terapéutica.

Publicaciones

- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L, y Lacal, J.C. (1998). Multiple signalling pathways lead to activation of the nuclear factor kB by the rho family of GTPases. *J.Biol. Chem.* 273, 12779-12785.
- Esteve, P., Embade, N., Perona, R., Jiménez, B., Del Peso, L., León, J., Arends, M., Miki, T. and Lacal, J.C. (1998) Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro e in vivo by a p53-independent but Bcl2 dependen pathway. *Oncogene*, 17, 1855-1869.
- Sanchez-Pérez, I., Murguía, J.R. y Perona. R. (1998). Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16, 533-540.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. y Lacal, J.C. (1999). Activation of the Serum Response Factor by rhoA is mediated by the nuclear factor κ B and c/EBP transcription factors. *J.*

Biol. Chem.274, 8506-8515.

Sanchez-Pérez, I. and Perona, R. (1999). Lack of c-jun activity increases survival to cisplatin. FEBS Lett. 453, 151-158.

Feramisco, J., Perona, R. y Lacal, J.C. (1999) Needle Microinjection. En Methods and tools in Biosciences and Medicine: Microinjection (Lacal, J.C., Perona, R. and Feramisco, J., eds.). Birkhäuser Verlag. Basel-Boston-Berlin pp 7-15

Perona, R., Dolfi, F., Feramisco, J. and Lacal, J.C. (1999). Microinjection of macromolecules into mammalian cells in culture. En Methods and tools in Biosciences and Medicine: Microinjection (Lacal, J.C., Perona, R. and Feramisco, J., eds.). Birkhäuser Verlag. Basel-Boston-Berlin pp 16-30

Tesis doctorales

Lourdes Gomez García“Estudio de las señales activadas por luz UVC implicadas en la expresión de MKP-1 y el efecto del pH alcalino en la activación de JNK”. Univ Autónoma. (1998). Directora: Rosario Perona. Calificación: Apto cum laude.

Isabel Sánchez Pérez“Estudio de los mecanismos moleculares activados por cisplatino y su relación con la inducción de muerte celular”. Univ Autónoma. Fac Medicina. (1998). Directora: Rosario Perona. Calificación: Apto cum laude.

María Luis Saniger Bernal“La activación del factor de respuesta a suero inducida por RhoA esta mediada por la actividad de los factores de transcripción NFkB y C/EBPb”. Univ. Autónoma. Fac. Medicina (1998). directores: Rosario Perona y Juan Carlos Lacal. Calificación: Apto cum laude.

Genética molecular de tumores neurogénicos: marcadores diagnósticos y mecanismos de progresión

Investigador Principal:	Pestaña, Ángel (Investigador Científico)
Investigadores Contratados:	Bello, María José (hasta 1999) Rey, Juan Antonio (hasta 1999)
Personal de Apoyo	Nebreda, Paloma (contratada desde 1998) Pestaña, Marcia (contratada, 1998-99)
Becarios Postdoctorales:	Alonso, Javier (desde 1998))
Becarios Predoctorales:	Mendiola, Marta (desde 1998)
Colaboraciones:	García-Miguel, Purificación, jefe Unidad Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Materno-Infantil La Paz Abelairas, José, médico adjunto, Servicio Oftalmología. Hospital Infantil La Paz Sarasa, José Luis (jefe adjunto de Anatomía Patológica) y Barnácer, M. (jefe del Servicio de Neurocirugía) de la Fundación Jiménez Díaz. Vaquero, J, jefe de Sección, Servicio de Neurocirugía de la Clínica Puerta de Hierro. JM de Campos (jefe de Servicio) y ME Kusak (adjunto), del Servicio de Neurocirugía, Hosp del Rio Hortega, Valladolid

Palabras Clave:

Tumores neurales, retinoblastoma, Ewing, mutaciones, deleciones, expresión múltiple, cienciometria

Alteraciones genéticas en el desarrollo y progresión de meningiomas y neurinomas

(M.J. Bello, J.A. Rey, M. Mendiola, A. Pestaña)

Como consecuencia de un estudio sistemático de deleciones del cromosoma 1p en 83 meningiomas, utilizando 40 marcadores polimórficos (sondas ADN y microsátélites) se han detectado dos regiones recurrentes de deleción (1p36-ter; 1934-32), lo que sugiere la posible implicación de varios genes oncosupresores en el desarrollo de este tipo de tumores. Entre los distintos genes candidatos propuesto en estas regiones cromosómicas, hemos elegido investigar en primer lugar el hRAD54, cuyo producto génico predecible se corresponde con las proteínas de la familia de las helicasas, cuyas mutaciones se han asociado con síndromes procancerosos. Dado que la pérdida de función de genes que salvaguardan la estabilidad del genoma puede estar implicada en el proceso tumorigénico, el gen hRAD54 ha sido propuesto como candidato a modificador tumoral en tumores con deleciones en 1p32 como meningioma, neuroblastomas, cáncer de mama, o cáncer endometrial. Sin embargo, la ausencia de mutaciones en un análisis mutacional completo de los 17 exones de hRAD54 en 32 muestras de meningiomas con deleciones en 1p nos ha conducido a descartar la implicación de este gen en la tumorigénesis de meningiomas. La única observación resultante de este estudio ha sido la identificación de un polimorfismo consistente en una transición de C >T en el nucleótido 2865, en la región codificante del gen, que da como resultado el cambio de codon GCT a GCC, que no altera el aminoácido correspondiente (Ala 730).

Este trabajo fué presentado por M.Mendiola como tesina de licenciatura (sobresaliente en junio de 1999) y sirve de base para un proyecto de cooperación con la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, encaminado a hacer un estudio comparativo de este polimorfismo entre la

población ecuatoriana y española.

Expresión génica múltiple inducida por el gen híbrido EWS-FLI1 característico de los tumores de Ewing

(J.Alonso, M. Mendiola, A.Pestaña)

Basados en la experiencia colaborativa con la Unidad de Hemato-Oncología Pediátrica del H. La Paz, que nos ha permitido el estudio molecular de tumores sólidos infantiles derivados de la cresta neural, hemos decidido abordar la cuestión, todavía no bien resuelta, de la identificación de los genes expresados en un tipo tumoral definido y su significación en la oncogénesis. La familia de tumores de Ewing se caracterizan por la presencia de una translocación clonal que da lugar a un gen quimérico integrado por exones de EWS (en 22q12) y genes de la familia de factores de transcripción Ets, ubicados en distintos cromosomas. Como consecuencia de la translocación se produce la expresión constitutiva de los factores de transcripción Ets, resultando en un mayor potencial transactivador de la expresión génica regulada por estos factores. Con el fin de contribuir a la anatomía genómica de los tumores de la familia Ewing, hemos iniciado el estudio del perfil de expresión génica múltiple inducido por la proteína de fusión EWS/FLI-1, que resulta de la traslocación t(11;22), la más frecuente en los tumores de la familia Ewing, utilizando metodologías SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) y *cDNA arrays* utilizando dos abordajes básicos: a) inhibición de la expresión constitutiva de la translocación en líneas celulares derivadas de tumores de Ewing tratadas con oligonucleótidos antisentido (introducidos con lipofectina) o transfectadas con cADN antisentido. b) Transfección estable de células humanas con el cADN de la translocación EWS/FLI-1.

Diagnóstico molecular en oncología pediátrica

(J.Alonso, P. Nebreda, A. Pestaña)

Además de estas investigaciones, el laboratorio mantiene una línea de actividad diagnóstica molecular en oncología pediátrica, especialmente de retinoblastomas, neuroblastomas, tumores de la familia Ewing y PNET. Dentro de esta actividad queremos resaltar el estudio mutacional de 38 familias con retinoblastoma que ha permitido identificar 12 mutaciones no descritas anteriormente. Este trabajo obtuvo el Premio Josep Padullés, de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (Salamanca, junio 1999)

Evaluación cuantitativa de la actividad investigadora

(M.Pestaña, A.Pestaña)

Postulamos que el sistema de ciencia y tecnología requiere -al igual que los investigadores individuales- una evaluación continuada que tenga en cuenta tanto los resultados (producción científica en término de publicaciones o patentes) como los medios disponibles para alcanzarlos. Con este criterio básico hemos abordado en colaboración con investigadores del CINDOC (Centro de Información y Documentación Científica, CSIC) y del DIT (Dep Ingeniería de Telecomunicaciones, Univ Politécnica de Madrid) el proyecto INDICYT, consistente en el desarrollo de una aplicación para la consulta interactiva en Internet de una serie de indicadores institucionales de ciencia y tecnología (publicaciones en distintas bases de datos, recursos humanos y económicos, ayudas a la investigación). Como parte de esta actividad hemos efectuado en colaboración con S. Cerdán un estudio de la productividad científica del equipamiento RMN de España.

Publicaciones

Leone P.E., Bello M.J., Mendiola M., Kusak M.E., De Campos J.M., Vaquero J., Sarasa J.L.,

- Pestaña A., Rey J.A. (1998) Allelic status of 1p, 14q, and 22q and *NF2* gene mutations in sporadic schwannomas. *Int. J. Molecular Medicine* 1, 889-892
- Leone P.E., Bello M.J., Mendiola M., Vaquero J., Sarasa J.L., Kusak M.E., De Campo J.M., Pestaña A., Rey J.A. (1998). Six novel mutations in the *NF2* tumor suppressor gene. *Int. J. Oncology* 12, 935-938
- Mendiola M., Bello M.J., Alonso J., Leone P.E., Vaquero J., Sarasa J.L., Kusak E., De Campos J.M., Pestaña A., Rey J.A. (1999) Search for mutations of the *hRAD54* gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Molecular Carcinogenesis* 24, 300-304
- Leone P.E., Bello M.J., De Campos J.M., Vaquero J., Sarasa J.L., Pestaña A., Rey J.A. (1999) *NF2* gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18, 2231-2239
- Pestaña A, Cerdán S. (1999) La resonancia magnética nuclear en España. *Mundo Científico* 206, 70-75
- Pestaña A (1999) ¿Fraude científico en España? *Mundo Científico* 206, 63.

Comunicación Intercelular y Señalización en Células Normales y Tumorales

Investigador Principal:	Villalobo, Antonio (Investigador Científico)
Becaria Postdoctoral:	Ruano Ramos, M ^a José
Becarias/os Predoctorales:	García-Nieto Hernaiz, Rosa M ^a (hasta Septiembre 1999) Palomo Jiménez, Paloma I. Hernández Hernando, Silvia (hasta Abril 1999) Hongbing Li Ortega Pérez, Inmaculada (hasta Marzo 1999)
Profesor Visitante:	Benaim, Gustavo (Universidad Central de Venezuela)
Estudiantes Visitantes:	Martínez de Narvaja, Eva (Universidad de Navarra, 1998) Salas, Valentina (Universidad Central de Venezuela, 1998) Lugo, Miguel (Universidad Central de Venezuela, 1999)
Estudiantes de Licenciatura	Prudencio Seseña, M ^a Concepción, UAM (1998) Antón Santos, Juan Miguel, UAM (1998) Fernández Ruiz, Mario, UAM (1999) Leoz Abellanas, Gonzalo, UAM (1999)
Personal de Apoyo:	Jiménez Martínez, Amparo Rodríguez Vargas, Carmen (1999)
Colaboraciones:	Benaim, Gustavo (Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela) Estrada, Carmen (Universidad de Cádiz, Cádiz) Gabiús, Hans-J. (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Alemania) Mena, M ^a Ángeles (Hospital Ramón y Cajal, Madrid) O'Brian, Catherine A. (The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Texas Medical Center, Houston TX, USA)

Palabras Clave

Calmodulina/fosfo(Tyr)calmodulina; ecto 5'-fosfodiesterasas/nucleótido-pirofosfatasa; lectinas; óxido nítrico; proteína quinasas activadas por mitógenos; receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Fosforilación de la calmodulina por el receptor del factor de crecimiento epidérmico

(P. I. Palomo-Jiménez, S. Hernández-Hernando, R. M. García-Nieto y A. Villalobo)

Nuestros trabajos han demostrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fosforila a la calmodulina en su Tyr99 en ausencia de Ca²⁺ y presencia de un polipéptido básico que actúa como cofactor. Más recientemente, hemos estudiado las consecuencias de dicha fosforilación sobre la actividad de la calmodulina cuando ésta actúa sobre sistemas dianas dependientes de la misma. Para dicho fin, hemos desarrollado un método para la purificación de fosfo(Tyr)calmodulina ultrapura libre de calmodulina no-fosforilada. Estas preparaciones de fosfo(Tyr)calmodulina se han utilizado para estudiar su potencial activador sobre la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina de corazón bovino comparándola con la calmodulina no-fosforilada. Al contrario de la acción activadora de la calmodulin no-fosforilada sobre este enzima, hemos demostrado que la

fosfo(Tyr)calmodulina pierde casi totalmente su capacidad de activar a la misma. Nuestros trabajos también parecen indicar que la fosfo(Tyr)calmodulina es un activador de la actividad tirosina quinasa intrínseca del EGFR, en presencia pero no en ausencia de EGF. Estos resultados se han obtenido en ensayos complejos en los que el receptor fosforila a la calmodulina en una primera etapa y posteriormente se estudia en una segunda etapa la capacidad del receptor de fosforilar a otro sustrato en presencia de la fosfo(Tyr)calmodulina acumulada. La extra-activación del EGFR supuestamente inducida por la fosfo(Tyr)calmodulina en estos ensayos secuenciales se previene por la inhibición de la fosforilación de la calmodulina usando un anticuerpo monoclonal contra ésta o usando especies de calmodulina que carecen del sitio de fosforilación por el EGFR. Así, las preparaciones de fosfo(Tyr)calmodulina ultrapuras, y libres de calmodulina no-fosforilada, recientemente obtenidas en nuestro laboratorio podrían servir para dilucidar la función reguladora de ésta sobre el receptor en un sistema más simple.

Regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por la señal del calcio en células normales y tumorales

(M. J. Ruano, P. I. Palomo-Jiménez y A. Villalobo)

En los últimos años hemos puesto en evidencia que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) aislado de tejido hepático es regulado por calmodulina, ya que ésta en presencia de Ca^{2+} , inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor. La acción del complejo Ca^{2+} /calmodulina se realiza interaccionando éste con un sitio de unión de la calmodulina localizado en la región citosólica yuxtamembranal del receptor en la que también se encuentra la Thr654, el sitio principal de fosforilación del receptor por proteína quinasa C (PKC). Esta fosforilación induce la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor y previene su internalización, por lo que en contraposición hemos propuesto que la inhibición de la tirosina quinasa del EGFR mediada por calmodulina podría iniciar una señal de internalización. Más recientemente, hemos comenzado el estudio de estos procesos en células intactas utilizando una serie de líneas celulares que expresan el EGFR tipo salvaje y receptores mutantes en el sitio de unión de la calmodulina y del sitio de fosforilación por PKC. Estos estudios se están realizando mediante el uso de inhibidores selectivos que interfieren con el normal funcionamiento de diversos sistemas supuestamente implicados en la regulación del EGFR. Nuestros resultados han puesto en evidencia hasta la fecha que el aumento de la concentración del Ca^{2+} citosólico inducida por ionóforos de Ca^{2+} producen una inhibición de la transfosforilación del EGFR y que un inhibidor permeante de la calmodulina incrementa esta inhibición. Por el contrario, EGFR mutantes en el sitio de unión de la calmodulina que poseen una inserción de secuencia no relevante, que divide este sitio en dos partes, parecen ser parcialmente resistentes a la acción inhibitoria del calcio. Por otro lado, el inhibidor permeante de la calmodulina previene en parte la transactivación del EGFR en ausencia y en presencia de inhibidores de la proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CaMPK-II). Estos resultados indican que la calmodulina (y/o la fosfo(Tyr)calmodulina) y otros sistemas dependientes de calcio están implicados en la regulación del EGFR en células intactas. Por otro lado, inhibidores de la PKC y de la CaMPK-II previenen en parte la inhibición de la transfosforilación del EGFR inducida por Ca^{2+} , ya que ambas proteínas quinasa regulan negativamente al receptor. Adicionalmente, hemos diseñado péptidos sintéticos permeables mimetizadores (PSPMs) de efectores fisiológicos con objeto de estudiar la regulación del sistema calmodulina/PKC sobre el receptor en células intactas. Estos PSPMs poseen una región N-terminal de secuencia hidrofóbica que permite su translocación a través de la membrana plasmática y una región C-terminal con la secuencia efectora. El primer PSPM que hemos desarrollado y ensayado posee una región efectora inhibitoria de todas las isoformas de la PKC. Ensayos preliminares indican que este PSPM permea las células. Sin embargo, este PSPM parece potenciar la acción inhibitoria del Ca^{2+} sobre la transfosforilación del EGFR, al contrario de lo que realizan los inhibidores químicos clásicos de la PKC, tal como el GF109203X. Esto indica que dicho PSPM ejerce alguna nueva acción sobre el receptor o sobre algún sistema adicional que lo modula.

Mutagénesis del sitio de unión de la calmodulina del receptor del factor de crecimiento

epidérmico

(I. Ortega, C. Rodríguez y A. Villalobo)

Utilizando proteínas de fusión, hemos demostrado que la región citosólica yuxtamembranal del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) une calmodulina. Este sitio, localizado entre los residuos 645-660 del receptor, posee además la Thr654, sitio preferente de fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) en el receptor, lo que induce la inhibición de la actividad tirosina quinasa del mismo y previene su internalización. La unión de calmodulina a la proteína de fusión previene la fosforilación mediada por PKC y recíprocamente, la fosforilación previa de la proteína de fusión por PKC previene la unión de la calmodulina a ésta. Con objeto de determinar el mecanismo de unión de la calmodulina en este sitio del receptor, hemos iniciado la mutagénesis de diferentes residuos del sitio de unión de la calmodulina con objeto de obtener células que expresen receptores mutantes incapaces de unir calmodulina para estudiar las consecuencias funcionales de la pérdida de este mecanismo de control.

Interacción de la calmodulin con proteínas implicadas en proliferación celular

(H. Li y A. Villalobo)

Con objeto de dilucidar los mecanismos de acción de la calmodulina sobre la proliferación celular mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), hemos iniciado una búsqueda de proteínas implicadas en la señalización mediada por este receptor que directa o indirectamente interactúan con la calmodulina en células intactas. Hemos demostrado que la calmodulina interactúa directamente con el EGFR usando células que sobreexpresan el EGFR humano, tales como fibroblastos murinos EGFR-T17 y células de carcinoma epidermoide A431. Por otro lado, hemos demostrado en células de adenocarcinoma humano SK-BR3 que la proteína adaptadora Grb7, que está implicada en la señalización mediada por el EGFR, podría interactuar indirectamente con la calmodulina mediante una proteína dependiente de ésta. Estos estudios se han realizado mediante técnicas de entrecruzamiento químico covalente entre la calmodulina y la proteína receptora de la misma y mediante el aislamiento de las proteínas dependientes de calmodulina por cromatografía de afinidad usando calmodulina inmovilizada.

Caracterización de ecto 5'-fosfodiesterasas/nucleótido-pirofosfatasas de tejido hepático normal y células de hepatocarcinoma

(R. M. García-Nieto y A. Villalobo)

Nuestro equipo ha caracterizado un grupo de proteínas adenililables de la membrana plasmática de células hepáticas de ratas normales (gp130, gp120, gp110 y gp100) y de células de hepatocarcinoma de rata AS-30D (gp125, gp115 y gp105). Tras purificar el dímero formado por la gp120-gp110 de tejido hepático normal y la gp115 de las células tumorales, hemos establecido que estas proteínas son ecto 5'-fosfodiesterasas/nucleótido-pirofosfatasas (5'-PDE/NPPasas) que forman intermediarios catalíticos adenililados. La gp120-gp110 de tejido normal fue identificada como la proteína PC-1, también denominada antígeno de diferenciación-1 de células plasmáticas, mientras que la gp115 de células tumorales AS-30D es una ecto 5'-PDE/NPPasa no descrita previamente. Las propiedades cinéticas de ambas enzimas fueron caracterizadas en detalle.

Regulación de la proliferación celular por óxido nítrico

(S. Hernández-Hernando, M. J. Ruano, M. Fernández, G. Leoz, A. Jiménez y A. Villalobo)

Nuestro grupo ha demostrado que el óxido nítrico inhibe la proliferación celular e induce

la S-nitrosilación reversible del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) inhibiendo la actividad tirosina quinasa intrínseca de éste. Estos trabajos se realizaron usando fibroblastos permeabilizados EGFR-T17 que sobreexpresan el receptor humano. Más recientemente, hemos estudiado este proceso en células intactas utilizando fibroblastos EGFR-T17 y células de carcinoma epidermoide humano A431 y una serie de donadores de óxido nítrico de la familia de los NONOatos. Adicionalmente a la caracterización de la acción inhibitoria del óxido nítrico sobre el EGFR, hemos demostrado que el óxido nítrico induce en células tumorales A431 la fosforilación en residuos de tirosina de una proteína de 58 kDa que hemos denominado NOIPP-58 (por Nitric Oxide-Induced 58 kDa Phospho-Protein). La fosforilación de la NOIPP-58 es estrictamente dependiente de EGF, se revierte rápidamente cuando se elimina el donador del óxido nítrico del medio y se previene por inhibidores de las p38MAPKs (p38 mitogen-activated protein kinases) pero no por inhibidores de ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 también denominadas p42/44MAPKs). Además, el óxido nítrico induce la activación de la vía de la p38MAPK tanto en ausencia como en presencia de EGF. El papel funcional de la NOIPP-58 y su posible relación con la vía de señalización de la p38MAPK está en estudio.

Efectos antimitogénicos de lectinas

(E. Martínez de Narvaja, M. C. Prudencio, J. M. Antón, A. Jiménez y A. Villalobo)

Las lectinas de origen animal parecen ejercer múltiples funciones fisiológicas, aunque muchas de ellas no están aun bien definidas. Con objeto de determinar si estas lectinas afectan a la proliferación celular, hemos estudiado el efecto de la galectina-1 de corazón bovino, lectina que reconoce específicamente b-galactósidos de diversos glicoligandos, sobre la proliferación de una serie de líneas celulares normales y tumorales. Hemos demostrado que en contraposición a la potente acción antimitogénica de la lectina VAA-1 (*Viscum album* aglutinina-1) del muérdago, una lectina de origen vegetal también específica de b-galactósidos, la galectina-1 solo ejerce una ligera acción antimitogénica o carece de efectos significativos a concentraciones comparables.

Publicaciones

Martín-Nieto, J., and Villalobo, A. (1998) The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 37, 227-236.

Villalobo, A., and Gabius, H.-J. (1998) Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses (Review). *Acta Anat.* 161, 110-129.

Díez, J.A., Elvira, M., and Villalobo, A. (1998) The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase phosphorylates connexin32. *Mol. Cell. Biochem.* 187, 201-210.

Benaim, G., Cervino, V., and Villalobo, A. (1998) Comparative phosphorylation of calmodulin from trypanosomatids and bovine brain by calmodulin-binding protein kinases. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 120, 57-65.

Palomo-Jiménez, P. I., Hernández-Hernando, S., García-Nieto, R. M., and Villalobo, A. (1999) A method for the purification of phospho(Tyr)calmodulin free of non-phosphorylated calmodulin. *Prot. Express. Purif.* 16, 388-395.

Ruano, M. J., Cabezas, J. A., and Hueso, P. (1999) Degradation of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid under different conditions. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 123, 301-306.

Tesis doctorales

Rosa M^a García-Nieto Hernaiz

"Aislamiento y estudio comparativo de dos 5'-fosfodiesterasas/nucleótido pirofosfatasas de la membrana plasmática de hígado de rata y de células del hepatocarcinoma de rata AS-30D". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Biología (1999). Director: Antonio Villalobo. Calificación: Sobresaliente Cum Laude.

Departamento de Bioquímica y Genética de Levaduras

Estudio estructura-función de transportadores ABC

Investigadora Principal:	Eraso, Pilar, Profesora Titular UAM
Investigadores Asociados:	Mazón, M ^a Jesús, Investigadora Científica, IIB Molano, Jesús, Jefe Clínico, Hospital La Paz
Becarios Predoctorales:	Falcón, Juan Manuel
Estudiantes Licenciatura	Vega, Susana (1998) Martín, Francisco (Octubre 98- Junio 99)

Palabras Clave

Saccharomyces cerevisiae, YCF1, CFTR, transportadores ABC, estructura-función

Identificación de residuos importantes para la función del transportador ABC de *Saccharomyces cerevisiae* Ycf1.

(J. M. Falcón, J. Molano, M. J. Mazón, P. Eraso)

El transportador ABC de *S.cerevisiae* Ycf1 (Yeast Cadmium Factor) confiere resistencia a Cd²⁺ y a otros metales y compuestos tóxicos que forman complejos o son conjugados con glutation, transportando esos complejos o conjugados al interior de la vacuola de forma activa. Con objeto de identificar residuos importantes para la función de la proteína se han creado mediante mutagénesis dirigida veintidós mutaciones únicas en residuos conservados de los dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2), transmembrana (TMD2) y regulador (R) de la proteína. La caracterización de los mutantes ha llevado a la identificación de residuos esenciales para la biogénesis, para la actividad transportadora o para la regulación de Ycf1.

Detección de interacciones entre dominios de Ycf1.

(J. M. Falcón, S. Vega, F. Martín, J. Molano, M. J. Mazón, P. Eraso)

Con objeto de detectar interacciones entre dominios funcionales de Ycf1 se ha llevado a cabo un análisis de supresión intragénica de tres mutaciones localizadas en el dominio NBD1 (G663V, G756D, y D777N), dos en el dominio NBD2 (G1306E y G1311R) y una en el dominio R (S908A). Todas ellas anulan la actividad transportadora de la proteína sin alterar su biogénesis. Las mutaciones localizadas en los NBDs afectan a la unión y/o hidrólisis de ATP mientras que la mutación del dominio R elimina el único sitio consenso de fosforilación por PKA, probablemente implicado en la regulación del transportador. Todos los revertientes de los mutantes G663V, G756D, G1306E y G1311R resultaron ser reversiones de la mutación primaria a la secuencia silvestre. En cambio se han aislado trece mutaciones supresoras de la mutación D777N y veinticuatro de la mutación S908A. Gran parte de las mutaciones supresoras se encuentran localizadas en los dominios transmembrana TMD1 y TMD2 lo que indica una interacción física y/o funcional de estos dominios con NBD1 y R. En estos casos el mecanismo de supresión implica una alteración de la especificidad de sustrato, siendo especialmente relevante la mutación W1225C, que suprime a ambas mutaciones. Esta mutación confiere a la levadura una resistencia específica para Cd²⁺ cuatro veces superior a la de la cepa silvestre, siendo la proteína mutante incapaz de transportar cualquier otro sustrato de Ycf1. Entre las mutaciones supresoras de la mutación S908A se encuentran las mutaciones, R206G, N210D, D213G, M226V y M230V, localizadas en la región amino terminal de la proteína lo que podría indicar un papel regulador del extremo amino terminal mediado por su interacción con el dominio R. Entre los supresores de la mutación S908A se encuentra el cambio S908T, lo cual

apoya la idea de la fosforilación *in vivo* de este residuo.

Modificaciones post-transduccionales de Ycf1.

(Ver resumen de M. J. Mazón)

Estudio estructura-función del canal Cl⁻ humano CFTR

(J. Molano, M. J. Mazón, P. Eraso)

La proteína humana CFTR (Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator), cuya alteración produce fibrosis quística, también pertenece a la familia de transportadores ABC y presenta una gran homología con la proteína de levadura Ycf1. Todas las mutaciones introducidas en Ycf1 y con las cuales se han llevado a cabo los análisis de supresión intragénica (ver más arriba) son mutaciones análogas a mutaciones encontradas en pacientes con fibrosis quística. Actualmente se están introduciendo en CFTR, mediante mutagénesis dirigida, algunas de las mutaciones equivalentes a las supresoras aisladas en Ycf1 con objeto de comprobar si también en CFTR son capaces de eliminar el defecto originado por la mutación primaria.

Publicaciones

Falcón-Pérez, J.M., Mazón, M.J., Molano, J. and Eraso, P (1999) Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 23584-23590.

Tesis doctorales

Juan Manuel Falcón Pérez

“Análisis de dominios funcionales del transportador ABC de *Saccharomyces cerevisiae*, Ycf1p, mediante mutagénesis dirigida y supresión intragénica”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Directora: Pilar Eraso Mazmela. Calificación: Sobresaliente “Cum Laude”

Relaciones entre el flujo glicolítico y los efectos producidos por azúcares en levadura.

Investigador principal: Gancedo, Carlos Profesor de Investigación

Becarios predoctorales: Petit, Thomas (hasta Enero 1999) Lafuente Monasterio, Maria José(hasta septiembre 1998) Flores Mauriz, Carmen-Lisset Rodríguez Iglesias, Cristina

Colaboraciones: Herrero, Pilar Universidad de Oviedo Leao, Cecilia, Universidad de Braga (Portugal)

Personal de apoyo: Bermúdez de Castro, Maria Isabel

Palabras clave

Levadura, glicolisis, hexokinasa, piruvato carboxilasa.

Relaciones entre el flujo glicolítico y los efectos producidos por azúcares en levadura.

(C. Gancedo, Thomas Petit, Carmen-Lisset Flores, Cristina Rodríguez)

En el estudio de mutantes que suprimen los efectos tóxicos de azúcares sobre diversos mutantes glicolíticos se ha mostrado que mutaciones en los genes GAL2 o GAL 4 son capaces de eliminar los efectos tóxicos de la galactosa sobre mutantes *gpm1* o *pyc1 pyc2* en *Saccharomyces cerevisiae*. Están en marcha la caracterización de los genes responsables de otras mutaciones que suprimen los efectos tóxicos de otros azúcares sobre los mismos mutantes anteriores.

Se ha mostrado que el gen que codifica la hexokinasa de *Yarrowia lipolytica*, posee un intrón. La proteína, extraordinariamente sensible a la inhibición por trehalosa-6-P, posee un "lazo" que no se encuentra en otras hexokinasas.

Estudio de genes relacionados con la regulación del flujo glicolítico en otros organismos.

(C. Gancedo, O. Zaragoza, C. Rodríguez).

Hemos estudiado el gen *TPS1* de la levadura *Candida albicans*. La interrupción de ambas copias cromosómicas del gen causa problemas en la formación de hifas y disminuye la infectividad del organismo. Se ha iniciado el estudio del gen *MIG1* de esta misma levadura.

Publicaciones

Blázquez M.A., Santos, E., Flores, C.L. Zapaer. J.M., Salinas, J., and Gancedo C.(1998) Isolation and characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene encoding trehalose-6-phosphate syntase. The Plant Journal 13,685-689.

Menéndez J., Delgado, J. and Gancedo C.(1998) Isolation of the *Pichia pastoris* *PYC1* gene encoding pyruvate carboxylase and identification of a suppressor of the *pyc* phenotype. Yeast,14, 647-654 .

Menéndez J., and Gancedo C.(1998).Regulatory regions in the promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *PYC1* and *PYC2* genes encoding isoenzymes of pyruvate carboxylase. FEMS Microbiol. Letters 164, 345-352.

Zaragoza, O., Blázquez, M.A. and Gancedo C. (1998) Disruption of the *Candida albicans* *TPS1* gene encoding trehalose-6-phosphate syntase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. J. Bacteriol., 180, 3809-3815.

Petit, T., Herrero, P. and Gancedo C.(1998) A mutation Ser²¹³/Asn in the hexokinase 1 from *Schizosaccharomyces pombe* increases its affinity for glucose. *Biochem. Biophys. Res Commun* . 251,714-719 .

Casal, M. Paiva, S., Andrade, R.P., Gancedo C. and Leao,C.(1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. *J. Bacteriol.* 181, 2620-2623 .

Lafuente M.J.,and Gancedo, C. (1999) Disruption and basic functional analysis of six novel ORFs of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae*.*Yeast* 15,935-943.

Petit, T., and Gancedo C.(1999) Molecular cloning and characterization of the gene *HXK1* encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast.* 15,1573-1584.

Tesis Doctorales

Maria Jose Lafuente Monasterio“Secuenciación y análisis funcional de 26kb del DNA de *Saccharomyces cerevisiae* y caracterización del gen responsable del fenotipo del mutante *DGT1-1*”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director Carlos Gancedo. Calificación: Sobresaliente cum laudem.

Thomas Petit“Caractérisation génétique et physiologique des hexokinases des levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Yarrowia lipolytica* et analyse physiologique de leur expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*”. Institut National de Sceinces Appliquées de Toulouse (Francia). 1999. Director Carlos Gancedo. Calificación: Mention très bien.

CarmenLisset Flores Mauriz“ Aislamiento y caracterización de mutantes que suprimen los efectos tóxicos de azúcares sobre mutantes fosfoglicerato mutasa negativos de *Saccharomyces cerevisiae*”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director Carlos Gancedo. Calificación: Sobresaliente cum laudem.

Recambio de proteínas de membrana plasmática en levadura. Mecanismos de endocitosis

Investigador Principal: Lagunas, Rosario. Profesora de Investigación.
Personal de Apoyo: Moreno, Eulalia.
Becarios Predoctorales: Lucero, Pilar
Peñalver, Élica

Palabras Clave

Endocitosis, recambio de proteínas de membrana, inactivación de transportadores, inactivación catabólica, *Saccharomyces cerevisiae*

La acumulación de trehalosa protege a la endocitosis de la inhibición por etanol.

P. Lucero y R. Lagunas (con la colaboración de E. Moreno y E. Peñalver)

Las proteínas de membrana en levadura tiene lugar en la vacuola tras su endocitosis y concentraciones de etanol menores que las que se encuentran en los habitats naturales de este organismo inhiben la endocitosis. Estos hechos cuestionaban la importancia de la endocitosis y, por lo tanto, del recambio de proteínas de membrana. Una posibilidad era que la endocitosis no fuera importante y por tanto que la ausencia o presencia del inhibidor fuera irrelevante. La otra posibilidad era que las células hubieran desarrollado algún mecanismo para evitar la inhibición. Investigamos ambas posibilidades y encontramos que la levadura acumula trehalosa cuando su supervivencia requiere una remodelación de la membrana. También encontramos que la acumulación de trehalosa impide la inhibición de la endocitosis por etanol. Concluimos de estos hechos que la trehalosa protege a la endocitosis, y por tanto al recambio de proteínas de membrana plasmática, del etanol y que esta protección es muy importante para la supervivencia de la levadura en la naturaleza.

Papel en la endocitosis de proteínas de revestimiento de vesículas.

E. Peñalver, R.Lagunas (con la colaboración de P. Lucero y E. Moreno)

Hemos investigado que proteínas de revestimiento de vesículas están implicadas en la endocitosis del transportador de maltosa. Usando mutantes defectivos en la cadena pesada de la clatrina y en varias subunidades de los complejos COPI y COPII, hemos encontrado que la clatrina y dos de las subunidades citosólicas del complejo COPII, las proteínas Sec23 y Sec 24, podrían estar implicadas en esta endocitosis. Nuestros resultados también indican que los requerimientos de la endocitosis del transportador de maltosa, que tiene 12 segmentos transmembrana (12-TMS), y la endocitosis de receptor del factor- α , que solo tiene 7-TMS, podrían ser distintos.

Mecanismo de la inactivación catabólica del transportador de maltosa

P. Lucero, E. Moreno, E. Peñalver y R. Lagunas

La adición de glucosa a levadura ayunada de fuente de nitrógeno desencadena la endocitosis y degradación de los transportadores de azúcares. Se viene suponiendo que esta inactivación, conocida como "inactivación catabólica", es uno de los mecanismos de control desarrollados por este organismo para usar glucosa preferentemente a cualquier otra fuente de carbono siempre que este azúcar se halla presente en el medio. Sin embargo nuestros resultados sugieren fuertemente que esta inactivación no es en realidad un mecanismo específico de control

del catabolismo, sino una consecuencia de la estimulación del recambio general de proteínas que provoca el ayuno de fuente de nitrógeno.

Publicaciones

Peñalver, E., Lucero, P., Moreno, E. and Lagunas, R. (1998) Catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved yeast could be due to the stimulation of general protein turnover. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 317-324.

Peñalver, E., Lucero, P. Eulalia, E. and Lagunas, R. (1999) Clathrin and two components of the COPII complex, Sec23p and Sec24p, could be involved in endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* maltose transporter. *J. Bacteriol.* 181, 2555-2563.

Análisis funcional de genes de levadura

Investigador Principal:	Mazón, María Jesús, Investigadora Científica
Investigadores Asociados:	Eraso, Pilar, Profesora Titular, UAM Molano Jesús, Jefe Clínico, Hospital La Paz
Personal de Apoyo	Morgado, Eulalia
Becarios Postdoctorales:	Duportets, Line (Septiembre 98 - Julio 99)
Becarios Predoctorales:	Escribano, Victoria (hasta Mayo 98) Silles Eduardo
Estudiantes Licenciatura:	Mateos, David (hasta Julio 99) Martínez-Burgos, Mónica (curso 98-99)
Colaboraciones:	Sandoval , Ignacio, Profesor de Investigación, CBM

Palabras Clave

Interrupción génica, análisis fenotípico, distribución intracelular de proteínas, chaperona, estructura-función, fosforilación

Análisis funcional de genes de levadura

(Victoria Escribano, Eulalia Morgado y María J. Mazón)

Dentro del programa europeo EUROFAN, hemos continuado el análisis fenotípico de los mutantes nulos de seis genes clonados y secuenciados durante la primera etapa del proyecto. Uno de los genes estudiados, *YGL133w*, codifica una proteína de gran tamaño, 1264 residuos, cuya función es desconocida. La interrupción de este gen conduce a una disminución en la capacidad de cruzamiento y a una morfología celular aberrante. Este fenotipo se detecta en la cepa mutante *MAT alfa* pero no en la mutante *MAT a*. Hemos mostrado, mediante una fusión a GFP, que la proteína Ygl133 se localiza en el núcleo y que la expresión de esta fusión complementa el fenotipo morfológico. Los mutantes de sexo *MAT alfa* expresan constitutivamente el gen *FUS1*, gen que en cepas silvestres sólo se induce en presencia de células de sexo opuesto. Actualmente estamos estudiando a qué nivel actúa este gen.

Mecanismo de importe de la Aminopeptidasa I a la vacuola de *S.cerevisiae*

(Eduardo Silles, Line Duportets y María J. Mazón, en colaboración con I.Sandoval)

La Aminopeptidasa I (API) es transportada a la vacuola de la levadura por una ruta, distinta de la ruta secretora clásica, que es coincidente en muchos de sus elementos con la vía autofágica. API no tiene señal de entrada al retículo endoplásmico y su transporte a la vacuola no es inhibido cuando se bloquea la ruta secretora. API se sintetiza como una forma precursora, con una extensión de 45 residuos en el extremo amino, que son proteolizados en dos etapas durante el importe a la vacuola. Este prepro péptido es necesario y suficiente para dirigir una proteína testigo como la GFP a la vacuola. Estamos intentando entender los mecanismos de este importe y para ello hemos buscado, utilizando distintos abordajes experimentales, proteínas capaces de interactuar con la región amino terminal de API potencialmente implicadas en el proceso de transporte. En esta búsqueda hemos encontrado que un miembro de la familia de las Hsp70, la chaperona citosólica Ssa1, interacciona "*in vitro*" con el extremo amino de API inmovilizado en

una agarosa Sulfolink. Actualmente estamos estudiando el efecto de una mutación termosensible en *SSA1* sobre el procesamiento de API "*in vivo*".

Estudio estructura-función de transportadores ABC : modificaciones post-traduccionales del factor de resistencia a cadmio Ycf1

(Mónica Martínez-Burgos, David Mateos, Jesús Molano, Pilar Eraso y María J. Mazón. Ver también resumen de P. Eraso)

Continuando con el estudio de la relación estructura-función de la proteína Ycf1, como modelo en levadura de transportadores de la familia ABC, estamos estudiando el posible papel del extremo amino de la proteína en su direccionamiento a la vacuola y en la función del transportador. Ycf1 comparte con algunas proteínas ABC un dominio amino terminal formado por 4 segmentos transmembrana (TMD₀) y un segmento citoplásmico de unión al resto de la proteína. Este dominio está procesado en la forma madura de la proteína. Hemos encontrado que la delección de TMD₀ no impide la localización correcta de la proteína Ycf1 en la membrana vacuolar pero sí abole su capacidad para detoxificar cadmio, indicando que el dominio procesado podría seguir interaccionando con la proteína y ser necesario para su función *in vivo*. También estamos interesados en conocer el efecto de la fosforilación de Ycf1 sobre su función. Para ello estamos estudiando las características cinéticas de los mutantes producidos mediante mutagénesis dirigida, en el único sitio consenso para PKA en el dominio regulador: Ser⁹⁰⁸/Ala, Ser⁹⁰⁸/Asp y Ser⁹⁰⁸/Glu y el efecto de la fosforilación *in vitro* con PKA sobre la capacidad transportadora de Ycf1.

Publicaciones

- Sütterlin, C., Escribano, V., Gerold, P., Maeda, Y., Mazón, M.J., Kinoshita, T., Schwarz, R.T. and Riezman, H. (1998) *Saccharomyces cerevisiae GPI10*, the functional homologue of human *PIG-B*, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem. J.*, 332, 153-159.
- Martínez, E., Seguí-Real, B., Silles, E., Mazón, M.J. and Sandoval, I. V. (1999) The prepropeptide of vacuolar aminopeptidase I is necessary and sufficient to target the fluorescent reporter protein GFP to the vacuole of yeast by the Cvt pathway. *Mol. Microbiol.* 33, 52-62.
- Falcón-Pérez, J.M., Mazón, M.J., Molano, J. and Eraso, P. (1999) Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 23584-23590.

Tesis doctorales

- María Victoria Escribano Hernández "Secuenciación de un fragmento de DNA del cromosoma VII de *Saccharomyces cerevisiae* y análisis funcional de las ORFs YGL133w, YGL134w, YGL136c, YGL138c, YGL142c e YGL144c". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1998. Directora: María Jesús Mazón. Calificación: Apto *cum laude*.

Análisis Molecular de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura.

Investigador Principal: Portillo, Francisco (Profesor Titular UAM)

Becarios Predoctorales: Fuente, Natalia de la

Palabras Clave

H⁺-ATPasa, estructura-función, mutagenesis dirigida, activación por glucosa.

Análisis genético del motivo ⁵³⁴DPPR.

(F. Portillo)

La secuencia ⁵³⁴DPPR es un motivo altamente conservado en todos los miembros de la familia de P-ATPasas y su papel en la estructura-función de la proteína es, hasta el momento, desconocida. Mediante mutagenesis dirigida hemos generado alelos mutantes en dicho motivo y hemos analizado bioquímicamente las ATPasas mutantes producidas por cada uno de los alelos. Los resultados sugieren que los residuos Asp-534 y Arg-537 están implicados en la unión del ATP y que los aminoácidos Pro-535 y Pro-536 están implicados en la interacción entre subunidades.

Aislamiento de genes implicados en la regulación de la H⁺-ATPasa.

(N. de la Fuente y F. Portillo)

La glucosa ejerce un control transcripcional y post-transcripcional sobre la ATPasa. A nivel post-transcripcional, la glucosa induce una activación de la ATPasa que es el resultado de una alteración de las constantes cinéticas del enzima: K_M para el ATP disminuye y la V_{max} aumenta. El extremo carboxilo terminal del enzima actúa en esta regulación como un dominio inhibidor, que interacciona con el sitio de unión a ATP y el sitio de transporte de protones para inhibir la actividad. La adición de glucosa a la levadura da lugar a la pérdida de esta interacción inhibidora lo cual parece mediado por una fosforilación del enzima. Las vías de señalización que intervienen en la alteración de la K_M y V_{max} son distintas. El análisis genético de mutantes afectados en la activación del enzima por glucosa sugiere que la vía de señalización WSC2/RHO1/PKC1/BCK1/MKK1/MPK1 está implicada en la alteración de la K_M del enzima.

Publicaciones

Maldonado, A.M., de la Fuente, N. and Portillo, F. (1998) Characterization of an Allele-Nonspecific Intragenic Suppressor in the Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene (*PMA1*). *Genetics* 150, 11-19.

Martín-Castillo, B. and Portillo, F. (1999) Characterization of Non-Dominant Lethal Mutations in the Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1417, 32-36.

Represión catabólica en levadura y control de morfogénesis

Investigadora principal: Sempere, Juana María (Gancedo), Profesora de Investigación
Investigador asociado: Gancedo, Carlos, Profesor de Investigación
Becarios predoctorales: Rivero, Tanilo (desde Mayo 1999)
Zaragoza, Oscar
Colaboraciones: Jauniaux, Jean-Claude, EMBL, Heidelberg
Moreno, Fernando, Universidad de Oviedo

Palabras clave

cAMP, fructosa-1,6-bisfosfatasa, levadura, morfogénesis, protein kinasa SNF1, represión catabólica

Papel del cAMP en la transcripción del gen *FBPI*

(O. Zaragoza y J.M. Gancedo)

Se ha mostrado que el cAMP reprime muy fuertemente la transcripción de un gen de fusión controlado por la secuencia activadora UAS1 y solo un 50% la transcripción dependiente de UAS2. El cAMP parece actuar bloqueando la expresión de los activadores Cat8 y Sip4. Se ha comprobado que el control por cAMP es redundante con mecanismos alternativos de regulación por glucosa.

Elementos que regulan la formación de pseudohifas en *S. cerevisiae*

(O. Zaragoza y J.M. Gancedo)

Se ha observado que el cAMP es capaz de inducir la filamentación en determinadas condiciones de crecimiento. El cambio morfogenético se produce en una variedad de situaciones de estrés: fuente de carbono pobre, presencia de alcoholes alifáticos, aumento de la temperatura o de la presión osmótica.

Vía de señalización de la glucosa

(M.J. Lafuente, C. Gancedo, J.-C. Jauniaux y J.M. Gancedo)

Hemos establecido que las colas citoplásmicas de los sensores de glucosa Snf3 y Rgt2 interaccionan con la proteína reguladora Mth1. Esta interacción está afectada por la concentración de glucosa en el medio y por mutaciones en Mth1. Se ha comprobado también que Mth1 reprime la expresión de transportadores de glucosa. Hemos puesto de manifiesto que la señalización por glucosa también puede ocurrir independientemente de Snf3 y Rgt2.

Regulación de la protein kinasa Snf1

(T. Rivero y J.M. Gancedo)

Snf1 es un elemento central para la desrepresión de genes reprimidos por glucosa. Se están intentando obtener mutantes en los que Snf1 sea activo en presencia de glucosa. Por una parte se ha transformado la levadura con plásmidos multicopia, se han seleccionado transformantes resistentes a 2-deoxiglucosa y se está procediendo a la caracterización de los genes supresores. Por otra parte se está realizando una mutagénesis aleatoria del gen *SNF1*.

Publicaciones

- Ordiz, I., Herrero, P., Rodicio, R., Gancedo, J.M. y Moreno, F. (1998) A 27kDa protein binds to a positive and a negative regulatory sequence in the promoter of the *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 329, 383-388.
- de Mesquita, J.F., Zaragoza, O. y Gancedo, J.M. (1998) Functional analysis of upstream activating elements in the promoter of the *FBP1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 33, 406-411.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334-361.
- Zaragoza, O., Lindley, C. y Gancedo, J.M. (1999) Cyclic cAMP can decrease expression of genes subject to catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 181, 2640-2642.
- Rodríguez, C. y Gancedo, J.M. (1999) Glucose signaling in yeast is partially mimicked by galactose and does not require the Tps1 protein. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 1, 52-58.

Departamento de Endocrinología Molecular

Mecanismos de regulación por hormona tiroidea en sistema nervioso central

Investigador Principal:	Bernal Carrasco, Juan, Investigador Científico
Investigadores Contratados:	Guadaño-Ferraz, Ana (1994) Perez Marquez, Julio (1998-1999)
Personal de Apoyo	Chacón Gallardo, Gloria
Becarios Postdoctorales:	Morte Molina, Beatriz (1998-) Vargiu, Pierfrancesco (1999-)
Becarios Predoctorales:	Morte Molina, Beatriz (1994-98) Vargiu, Pierfrancesco (1994-99) Lorenzo Ovejero, Petra Isabel (1994-99) Escámez Toledano, María José (1997-) De Abajo, Ricardo (1999-) Manzano Moltó, Jimena (1999-)
Colaboraciones:	Coloma Jerez, Antonio, Intst Ivest Biomedicas De Felipe, Javier, Instituto Cajal, CSIC DeLecea, Luis, Scripps Research Institute Muñoz Terol, Alberto, Inst Invest Biomedicas Rausell, Estrella, Deptº Morfología, UAM StGermain, Donald L., Dartmouth Medical School Sutcliffe, J. G., Scripps Research Institute Vennström, Bjorn, Karolinska Institute, Estocolmo

Palabras Clave

hormonas tiroideas, desyodadas, Ras, neurogranina, cerebro, núcleo estriado

Expresión del gen neuronal RC3/NRGN: identificación del elemento de respuesta a T3

(C. Martínez de Arrieta, B. Morte, J. Manzano, A. Coloma, J. Bernal)

Entre los genes regulados por la hormona tiroidea en cerebro de rata identificados por nuestro laboratorio en los últimos diez años, hemos estudiado en más profundidad el denominado RC3 / neurogranina, que codifica un substrato de PKC. La expresión de este gen es sensible a hormona tiroidea sólo en algunas regiones cerebrales, fenómeno que no es dependiente de la expresión diferencial de los receptores de T3. A pesar de esto, el efecto hormonal es directo y a nivel de transcripción, probablemente debido a la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta hormonal situados en regiones reguladoras del gen. Para localizar el elemento de respuesta a T3, en el laboratorio de A. Coloma se había clonado previamente el gen humano, al que se denominó NRGN. Se determinó su estructura en intrones y exones y se prepararon fragmentos mediante PCR solapantes que abarcaban la totalidad del gen (unas 11 kb). Estos fragmentos se marcaron y se inmunoprecipitaron con receptor de T3 y un anticuerpo antireceptor. De esta forma se obtuvieron fragmentos de DNA capaces de unir el receptor de T3. Mediante inmunoprecipitaciones de fragmentos cada vez más pequeños, y técnicas de retardo de movilidad electroforética y de footprinting, pudimos localizar el elemento de respuesta en el primer intrón a unas 3 kb del inicio de transcripción. La presencia de un elemento de respuesta a T3 en el gen humano NRGN indica que éste, al igual que su homólogo en rata, es dependiente de hormona

tiroidea, conclusión importante a la vista de la implicación de este gen en fenómenos de plasticidad sináptica y memoria.

La expresión de desyodasas tipos 2 y 3 revela nuevas funciones biológicas de las hormonas tiroideas

(A. Guadaño-Ferraz, M.J. Escámez, A. Cuadrado, E. Rausell y J. Bernal)

Las desyodasas son selenoenzimas que metabolizan las hormonas tiroideas mediante eliminación secuencial de átomos de yodo. La desyodasa tipo 2 (D2) elimina el yodo en posición 5', generando el compuesto activo T3 a partir de T4; la desyodasa 3 (D3) elimina el yodo en posición 5, generando metabolitos inactivos: rT3 a partir de T4, y T2 a partir de T3. En el sistema nervioso central el 80% de la T3 se genera localmente por la actividad de D2, por lo que la actividad combinada de ambas desyodasas es un mecanismo muy eficiente para mantener la concentración de T3 muy regulada dentro de límites estrechos. Debido a la importancia homeostática de estas desyodasas y a la total falta de datos, hemos estudiado mediante hibridación *in situ* la expresión de D2 y D3 en encéfalo de rata durante el desarrollo.

La D2 se expresa fundamentalmente en células gliales, en astrocitos protoplásmicos y en los tanicitos que recubren la pared de tercer ventrículo. Los astrocitos captarían T4 de la sangre, generando T3 para las neuronas; los tanicitos captarían T4 del líquido cefalorraquídeo produciendo T3 para el mismo LCR y para la eminencia media. Es sabido que en el hipotiroidismo se produce un incremento de la actividad D2, como mecanismo compensador que tiende a mantener las concentraciones de T3. En animales hipotiroideos hemos comprobado un incremento de expresión de D2 que no ocurre en todas las regiones del cerebro, sino selectivamente en los núcleos de las vías somatosensorial, especialmente la vía trigeminal, y auditiva. Puesto que estas vías estarían selectivamente protegidas frente a una situación de hipotiroidismo se puede deducir, teleológicamente, que la hormona tiroidea ejerce acciones importantes, pero desconocidas, en el desarrollo de estas vías.

La D3, al contrario de la D2, no se expresa en glia, sino en neuronas, proporcionando un mecanismo de degradación de la T3. Durante los primeros días después del nacimiento D3 se expresa de forma selectiva en áreas relacionadas con la diferenciación sexual, es decir el núcleo del lecho de la estría terminal, el área preóptica y la amígdala medial. Todavía no conocemos el significado de estos hallazgos, pero sugieren la necesidad de una regulación exquisita de T3 en estas áreas, al mismo tiempo que dejan la sospecha de la existencia de alteraciones en la diferenciación y/o conducta sexual que pudieran tener su origen en alteraciones de la D3.

Identificación de Rhes, una nueva proteína Ras regulada por hormona tiroidea

(P. Vargiu, J. Perez, R. de Abajo, J. Falk, J.G. Sutcliffe y J. Bernal)

Tras el rastreo de una colección de clones de cDNA de secuencias enriquecidas en núcleo estriado de rata y aislados por hibridación substractiva, seleccionamos uno de ellos que hibridaba con un RNA cuya abundancia estaba drásticamente regulada por la hormona tiroidea. A partir de la secuencia del extremo 3' se aisló el cDNA completo. La traducción conceptual del ORF reveló que codifica una nueva proteína de 266 aminoácidos de la familia Ras a la que hemos denominado Rhes (Ras homolog enriched in striatum, clave de acceso AFI34409). Esta proteína guarda un 62% de identidad con otra proteína de la familia denominada dexas porque se induce por dexametasona en hígado. Se ha identificado la secuencia homóloga humana, con la que posee un 95% de identidad, en una secuencia genómica del cromosoma 22q13.1 (clave de acceso AL022334). En la actualidad se está estudiando la interacción de Rhes con efectores de Ras.

Publicaciones

Alvarez-Dolado, M., Gonzalez-Sancho, J.M., Bernal, J. y Muñoz, A. (1998) Developmental

expression of tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 84: 309-322.

Bernal, J. (1998) Síndrome de Resistencia a hormonas tiroideas. En: Actualizaciones en Endocrinología: Tiroides. McGraw-Hill/ Interamericana.

Bernal, J. y Guadaño-Ferraz, A. (1998) Thyroid hormone and the development of the brain. *Curr Op Endocrinol Diabetes*. 5:296-302.

Casado, M., Martín, M., Muñoz, A. y Bernal, J. (1988) Vitamin D3 inhibits proliferation and increases c-myc expression in fibroblasts from psoriatic patients. *J Endocrinol Invest* 21:520-525.

García-Fernández, L.F., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J. y Muñoz, A. (1998) Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostanoid synthase (b-trace) gene. *Mol Brain Res* 55: 321-330.

Alvarez-Dolado, M., Ruiz, M., Del Río, J.A., Alcántara, S., Burgaya, F., Sheldon, M., Nakajima, K., Bernal, J., Howell, B.W., Curran, T., Soriano, E. y Muñoz, A. (1999) Thyroid hormone regulates reelin and *dab1* expression during brain development. *Journal of Neuroscience* 19: 6979-6993.

Bernal, J. (1999) Iodine and Brain Development. *BioFactors* 40: 271-276.

Bernal, J. (1999) Regulación de la expresión génica en la síntesis de hormonas y sus receptores. En: *Endocrinología básica y clínica* (Tresguerres, J.A.F., ed). Editorial Síntesis, Madrid.

Cuadrado, A., Bernal, J. y Muñoz, A. (1999) Identification of the mammalian homolog of the splicing regulator suppressor-of-white-apricot as a thyroid hormone regulated gene. *Mol Brain Res*. 71:332-340.

Escámez, M.J., Guadaño-Ferraz, Cuadrado, A. y Bernal, J. (1999) Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology*. 140:5443-5446.

Falk, J.D., Vargiu, P., Foye, P.E., Usui, H., Perez, J., Danielson, P.E., Lerner, D.L., Bernal, J. y Sutcliffe, J.G. (1999) Rhes: a striatal-specific ras homolog related to dextran. *J Neurosci Res* 57: 782-788.

Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Rausell, E. y Bernal J. (1999) Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci*. 19: 3430-3439.

Martínez de Arrieta, C., Morte, B., Coloma, A., Bernal, J. (1999) The human RC3 gene homolog, NGRN contains a thyroid hormone responsive element located in the first intron. *Endocrinology* 140: 335-343.

Tesis doctorales

Lorenzo Ovejero, Petra Isabel

“Regulación del gen neuronal tubulina alfa-1 por hormona tiroidea”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Biología. 1999. Director: Juan Bernal. Calificación: Sobresaliente Cum Laude

Vargiu, Pierfrancesco

“Identificación de un nuevo miembro de la familia Ras regulado por hormona tiroidea”.
Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Biología. 1999. Director: Juan Bernal.
Calificación Sobresaliente Cum Laude

Activación y señalización diferencial de las proteínas Ras.

Investigador Principal: Crespo Baraja, Piero. Científico Titular, CSIC

Becarios Predoctorales: Ajenjo Garcia, Nuria
Arozarena Martinicorena, Imanol
Matallanas Gonzalez, David
Sanz Moreno, Victoria

Colaboraciones: Bustelo, Xose. CSIC, Salamanca.
Gutkind, Silvio. National Institutes of Health, USA
Lafarga Coscujuela, Miguel. Univesridad de Cantabria
León Serrano, Javier. Universidad de Cantabria
Lopez-Otin, Carlos. Universidad de Oviedo

Palabras Clave

Transducción de señales, MAP kinasas, p38, Ras, Proteínas G, Factores de Intercambio

Mecanismos de activación de las MAP kinasas ERK1/ 2 por Bcr-Abl y su papel en la diferenciación mieloide y la transformación leucémica.

(N. Ajenjo)

Con el fin de determinar su posible utilización como dianas terapéuticas, estudiamos el papel que las MAP kinasa ERK 1/2 desempeñan en la proliferación y diferenciación leucémica. Trabajando en una serie de líneas establecidas de leucemia mileoide crónica hemos observado que, al contrario de otros tipos de tumores, la proliferación y diferenciación leucémica es completamente independiente de la activación de ERK. Actualmente estudiamos si este fenómeno es una característica adquirida por la condición leucémica o es inherente a las células hematopoyéticas en condiciones normales.

Regulación diferencial de la MAP kinasa p38 HOG y su isoforma Mxi2.

(Victoria Marta Sanz Moreno)

Otro de nuestros objetivos es el estudio de la función y regulación de la kinasa Mxi2, isoforma de splicing de p38 de la que sólo difiere en los 17 aminoácidos carboxi terminales. A este respecto hemos encontrado que la especificidad de esta kinasa, tanto en substratos como en sus activadores es distinta a la de p38. También en su respuesta a la inhibición por protein-fosfatasas e inhibidores farmacológicos hay diferencias entre p38 y Mxi2, a este respecto hemos encontrado que la sensibilidad a la inhibición por el fármaco SB 98059 se confiere en parte por el extremo carboxi terminal de las proteínas. Además se está estudiando la ruta de señalización que conduce a la activación de Mxi2 y estudios preliminares sugieren que difiere considerablemente de la de p38.

Función del dominio DH en factores de intercambio de Ras: mecanismos de acción de Ras-GRF

(Imanol Arozarena Martinicorena)

Este estudio se centra en dilucidar el papel que los dominios DH (Dbl Homology), característicos de proteínas que interaccionan con las GTPasas de la familia Rho, desempeñan en la regulación de la actividad de Ras. Inicialmente hemos utilizado como modelo el factor de

intercambio Ras-GRF. Hemos observado que GRF activa potentemente ERK2, sin embargo un mutante de GRF que carece del dominio DH, es incapaz de activar ERK2. Asimismo este mutante tampoco induce intercambio en Ras ni transformación celular. A tenor de estos resultados, observamos que un dominante inhibitorio de la GTPasa de la familia Rho Cdc42, inhibe el intercambio sobre Ras, la activación de ERK2 y la transformación inducidos por GRF. Sin embargo, Cdc42 y Ras-GRF no interactúan físicamente. Según nuestros resultados, Cdc42 estaría involucrado en el control del proceso mediante el cual Ras-GRF se transloca a la membrana celular, requisito indispensable para activar Ras, esta unión se realizaría mediante una proteína que no hemos identificado aun y cuya accesibilidad a Ras-GRF estaría regulada por Cdc42 en su forma GDP pero no GTP. Lo que apunta a un mecanismo molecular completamente nuevo, mediante el cual la estimulación del intercambio sobre una GTPasa de la familia Rho, posibilitaría la activación de Ras. Además el que una proteína de la familia Rho, como Cdc42, esté regulando la actividad de un factor de intercambio de Ras es algo completamente novedoso.

Función y especificidad de las isoformas de Ras

(David Matallanas Gomez)

Es bien sabido que Ras cuenta con tres isoformas principales H, K y N-Ras, presentes en todos los tipos celulares. Aunque experimentos recientes apuntan a que dichas isoformas tendrían diferentes funciones, estas diferencias son casi completamente desconocidas. Como estrategia para abordar esta cuestión, actualmente estamos generando mutantes dominantes inhibitorios de K y N-Ras, además del ya conocido H-Ras N17. Resultados preliminares sugieren que, a pesar de compartir factores de intercambio, estos mutantes inhiben específicamente sus formas salvajes. Por lo que se emularía el comportamiento de los mutantes de las GTPasas de la familia Rho que son altamente específicos. Una vez comprobada la funcionalidad de estos mutantes se utilizarán para dilucidar las antedichas diferencias entre H,K y N-Ras.

Publicaciones

- Crespo P., Gutkind J.S. y Bustelo X.R. (1998) El oncogén vav. *Investigación y Ciencia* 262, 63-71.
- Freije J.M.P., Blay P., Pendás A.M., Cadiñanos J., Crespo P., and López-Otín C. (1999). Identification of two human proteins similar to yeast enzymes involved in proteolytic maturation of farnesylated proteins. *Genomics* 58, 270-280.
- Lerga A., Crespo P., Berciano M.T., Delgado M.D., Cañelles M., Calés C., Richard C., Ceballos E., Gutierrez P., Ajenjo N., Gutkind J.S. and León J. (1999). Megakaryocyte and monocytic-macrophagic differentiation in K562 cells induced by modifiers of Protein Kinase C: regulation and involvement of c-Myc/Max. *Cell Growth & Diff.* 10, 639-654.
- Movilla N., Crespo P., and Bustelo X.R. (1999). Signal transduction elements of TC21 an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene* 18, 5860-5869.
- Crespo P. (1999) Transformación leucémica por oncoproteínas citoplasmáticas. En: *Base Molecular y Celular de las Leucemias* (C. Richard y L. León, eds.). Rocha Farma. Gijón, pp. 235-241.

Producción y acción de hormonas tiroideas en diferentes fases de desarrollo, con especial énfasis en la comunicación materno-fetal y la deficiencia de yodo.

- Investigador principal: Morreale de Escobar, Gabriela, Profesor de Investigación, Doctor vinculado "Ad Honorem" a partir de Junio 1995.
- Investigadores asociados: Escobar del Rey, Francisco, Profesor de Investigación (jubilado), Doctor vinculado al IIB
Obregón, M^a Jesús, Investigador Científico
- Colaboraciones: Escobar-Morreale, Hector, Hospital Ramón y Cajal, Madrid
Ares, Susana, Unidad de Neonatología, Hospital "La Paz", Madrid
Berbel, Pere, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández, Alicante
Jauniaux, Eric, King's College de Londres, Reino Unido
Tovar, Juan, Cirujía Infantil, Hospital "La Paz", Madrid
van der Heide, Daan, Agricultural University. Wageningen, Holanda.
- Becarios postdoctorales: Arufe Gonda, María del Carmen (Octubre,1999)
- Becarios predoctorales: Lavado Autric, Rosalía
- Personal de apoyo: Durán Ruiz, Socorro
Presas Castilla, M^a Jesús

Palabras claves

tiroxina, triyodotironina, yodo, cerebro, feto, neonato, embarazo, prematuros

Interrelaciones entre hormonas tiroideas tisulares y circulantes, en ratas adultas.

(Héctor Escobar-Morreale, M, J, Obregón, F. Escobar del Rey, S. Durán, M. J. Presas, G. Morreale de Escobar)

Se tiroidectomizaron ratas hembras adultas, que se infundieron posteriormente durante dos semanas con diferentes dosis de tri-iodotironina (T3), o de placebo, cubriendo un amplio rango de concentraciones, de forma que había grupos deficientes en hormonas tiroideas (hipotiroideos) y grupos que recibían un exceso (hipertiroideos). Este estudio venía a completar otros anteriores, realizados en ratas tiroidectomizadas, infundidas con tiroxina (T4), o combinaciones de T4+T3. Se determinaron las concentraciones de T4 y T3 circulantes y en numerosos tejidos, así como las actividades de diferentes enzimas desyodantes, en hígado, pulmón, corteza cerebral, tejido graso pardo e hipófisis. Estos animales tienen concentraciones prácticamente indetectables de tiroxina (T4), tanto en la sangre como en los tejidos. La concentración circulante de T3 fué aumentando en función de la dosis de T3. La concentración de T3 en algunos tejidos fué aumentando paralelamente a la circulante. Sin embargo, en otros tejidos, que dependen de la T4 para su desyodación local a T3, las concentraciones de T3 eran más bajas que lo que se podría esperar por las correspondientes concentraciones circulantes. Un hallazgo inesperado fué que otros tejidos presentaron un patrón opuesto de cambios de la T3: la concentración en ovario, y pulmón, por ejemplo, aumenta más de lo que sería de esperar por los cambios plasmáticos. Estos resultados no se justifican por cambios en la actividad de los isoenzimas desyodantes, y sugieren la existencia de otros mecanismos de regulación de la concentración de T3 que son específicos de tejidos, y que no están aún bien caracterizados.

Adaptación intra- y extra-tiroidea de la rata adulta a diferentes grados de deficiencia de yodo

(P.E. Pedraza, H.F. Escobar-Morreale, F. Escobar del Rey, M. J. Obregón, G. Morreale de Escobar, S. Durán, M.J. Presas).

Se han alimentado ratas hembra Wistar adultas durante tres meses con agua destilada y una dieta con contenido muy bajo en yodo (Low iodine diet, LID), con la misma dieta suplementada con diferentes cantidades de IK, o con una cantidad muy pequeña (0.005%) de ClO_4K . Esto último tenía como fin disminuir aún más la cantidad de yodo de la dieta LID que podía ser captada por el tiroides. Asumiendo un consumo diario de unos 20 g de comida seca, la ingesta diaria de los diferentes grupos era, en μg I: grupo LID+5.0: 5 μg ; LID+1.0: 1 μg ; LID+0.5: 0.5 μg ; LID: 0.05 μg ; LID+ ClO_4K (grupo LID'): 0.02 μg . Se midieron el peso del tiroides, su contenido en yodo, T4 y T3, y la actividad del enzima iodotironina desiodasa tipo I (5'D-I): Asimismo, se midieron T4, T3 y TSH circulantes, T3 y T4 en once tejidos diferentes, y la actividad de los isoenzimas 5'D-I y 5'D-II en varios de ellos. Se encontró que los mecanismos de adaptación a una deficiencia leve de yodo son eminentemente intra-tiroideos y autorregulatorios, incluido el aumento del peso de la glándula, y preceden a un aumento de la TSH circulante, que no se observa hasta llegar a una situación de deficiencia de yodo moderada. En este último caso, se activan numerosos mecanismos de adaptación extra-tiroideos. Unos y otros son tan eficaces, que incluso en animales con una ingesta de yodo $>5\%$ de la de los controles, la mayoría de los tejidos mantienen concentraciones normales de T3, y no pueden considerarse hipotiroideos. No ocurre así con aquellos tejidos que dependen principalmente de la T4 como fuente local de generación de T3, como la corteza cerebral, que es deficiente en T3 incluso con una deficiencia moderada de yodo. Los mecanismos extra-tiroideos, aún no bien caracterizados, que se estimulan ante una deficiencia muy grave de yodo cooperan con los intra-tiroideos tan eficazmente, que incluso en animales en los que la T4 circulante ha disminuído al 5 %, y la T3 circulante al 45 % de lo normal, algunos tejidos (como ovario y pulmón) siguen con concentraciones normales de T3. Estos resultados ponen de manifiesto que el estado de eu- ó hipo-tiroidismo de animales con deficiencia de yodo no sólo depende de la intensidad de la carencia, sino que es específico de tejido. Asimismo, alertan sobre la posibilidad de que no sólo se encuentren alteraciones de funciones cerebrales en endemias con deficiencias muy graves de yodo, sino también en áreas con deficiencia de yodo leve-moderada.

Disfunciones por deficiencia de yodo en España

(F. Escobar del Rey, R. Lavado Autric, J. A. Vázquez, S. Durán, M.J.Presas, G. Morreale de Escobar)

Se ha seguido colaborando con los numerosos grupos que están investigando la deficiencia de yodo en diferentes zonas de España, dedicando especial atención a la evolución de la endemia de Las Hurdes Altas. Estos estudios han puesto de manifiesto que éste sigue siendo un importante problema de salud pública, que urge eliminar.

Se iniciaron medidas profilácticas en dicha región en 1982, dirigida sobre todo a los escolares. Quince años después se comprobó que la ingesta de yodo de los escolares, medida por la ioduria, era ya aceptablemente buena y la incidencia de bocio había disminuído del 80 al 10 %. También se había normalizado la T4 circulante, y el desarrollo somático de los niños. Sin embargo, el desarrollo mental seguía afectado. Para evaluar la posibilidad de que este retraso no estuviera relacionado con la ingesta de yodo, sino con algún otro factor nutricional o genético, se midió la agudeza auditiva de los escolares. Una disminución de la misma es una disfunción muy característica de la deficiencia de yodo padecida intra utero. Se encontró que el porcentaje de escolares con una disminución de la agudeza auditiva, medida por transmisión ósea, era significativamente más alta que la de escolares de una zona control. Este hallazgo apoyaba la idea de que la disminución media de 15 puntos en el cociente intelectual de estos escolares estuviese efectivamente relacionada con una deficiencia de yodo padecida intra utero. No podíamos tener datos de las madres de los escolares estudiados, pero se comprobó que las embarazadas actuales siguen padeciendo una deficiencia de yodo muy superior a la que se encontraba en los escolares. Más del 50 % ingería menos de la mitad del yodo que se

recomienda en el embarazo y la lactancia.

Mientras no se suministren de 200-300 μg de yodo/día a las mujeres desde el comienzo del embarazo, va a ser difícil erradicar las todas las disfunciones por deficiencia de yodo, sobre todo las que se iniciaron durante el desarrollo fetal temprano.

Deficiencia de yodo en mujeres embarazadas.

(G. Morreale de Escobar , Javier de Santiago, F. Escobar del Rey, , S. Durán, M.J.Presas)

Se ha llevado a cabo un estudio del estado nutricional de yodo en mujeres embarazadas de la Comunidad de Madrid (CAM), catalogada por estudios anteriores en escolares como de deficiencia leve (Grado I). Se estudiaron más de 400 mujeres normales con embarazos normales (grupo A) y, a la vista de los resultados, otras 130 a las que se les suministró un suplemento polivitamínico que contiene IK en cantidades adecuadas (250-300 μg I) desde el comienzo del embarazo (Grupo B). Se midieron el yodo y creatinina en orina para calcular la ingesta de yodo, y nueve parámetros séricos de función tiroidea. Se encontró que casi el 50 % de las mujeres A ingerían menos de la mitad de la cantidad recomendada (250 μg I/día). El 24 % de ellas tenía bocio (volumen tiroideo > 20.8 ml) al final del embarazo, habiendo una buena correlación entre el volumen tiroideo y la ioduria. Estos datos indican que durante el embarazo las mujeres de la CAM tienen una deficiencia de yodo moderada (Grado II). Más del 80% de las mujeres suplementadas del grupo B ingerían la cantidad recomendada, y ninguna de ellas desarrolló bocio. Las mujeres del grupo A tenían una tiroxina libre (FT4) significativamente más baja que las del grupo B en los tres trimestres, habiendo una correlación significativa entre la FT4 y la yoduria. La FT3 sin embargo, estaba aumentada, como era de esperar con este grado de deficiencia de yodo, y como consecuencia de ello, no aumentó la hormona tirotrópica (TSH). Un muestreo de orinas de mujeres embarazadas de otras zonas de España, indica que se trata de un problema muy extendido y de gran importancia socio-económica.

Estos datos son muy alarmantes, ya que hay creciente evidencia de que un valor bajo de FT4 (< al percentil 10) en el primer trimestre conlleva un aumento del riesgo de que el niño tenga una disminución del cociente de desarrollo psicomotor de hasta 15 puntos. En el grupo A, el porcentaje de mujeres con FT4 baja en el primer trimestre se duplicó respecto del encontrado en el grupo B, por lo que también se duplica el número de niños cuya inteligencia puede verse afectada. Esto es tanto más lamentable, en cuanto que se trata de algo fácilmente prevenible, mediante normalización de la ingesta de yodo de la mujer embarazada, siguiendo recomendaciones internacionales.

Hipotiroidismo materno y migración de células cerebrales.

(R. Lavado, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar, P. Berbel)

Se han ido completando estudios iniciados anteriormente, encaminados a la obtención de un modelo experimental en rata que permita el estudio de los mecanismos etiopatogénicos de las lesiones del sistema nervioso central debidas a hipotiroidismo materno durante fases iniciales del desarrollo del cerebro. Para ello se alimentan las futuras ratas madres con dietas con un contenido muy bajo de yodo (<0.1 μg I/día), manteniéndolas en estado de deficiencia grave durante la preñez y lactancia. Estas ratas son muy hipotiroxémicas, pero no son clínicamente hipotiroideas por tener concentraciones normales de T3 circulante. Una proporción importante de su prole sufre lesiones neurológicas (que se manifiestan por convulsiones audiogénicas), que ya son irreversibles al nacer. Se trata de un modelo experimental del cretinismo neurológico humano.

Usando este protocolo, se inyectaron hembras muy deficientes en yodo, y sus controles (que reciben la misma dieta suplementada con cantidades fisiológicas de IK), con Bromodesoxi-uridina (BrdU, 2 mg/100 g) a los 14 d de gestación (E14), E15 y E16, y otras a E17, E18 y E19. Las crías se mataron a 40 d de edad, obteniéndose cortes coronales para estudiar la corteza somatosensorial y el hipocampo, empleando anti-BrdU biotinilado.

Tanto en neocorteza como en hipocampo de crías de madres hipotiroxémicas había células BrdU+ heterotópicas que aparecieron en sustancia blanca subcortical (inyec. E14-E16), o en número aumentado en capa V (inyec. E17-E19). En el hipocampo (muy afectado en el cretinismo neurológico) las células heterotópicas se observan en el estrato oriens y en el

radiatum de la región CA1.

Por tanto, la mera hipotiroxinemia materna, sin hipotiroidismo clínico, altera la migración de las células que entraron en fase S del ciclo celular en la 1ª y 2ª mitad de la histogénesis cortical (inyec. E14-E16 y E17-E19, respectivamente), y esta alteración puede ser causa de las lesiones neurológicas irreversibles indicadas arriba. En el hombre esta fase de la neurogénesis se inicia entre el final del 1º e inicio del 2º trimestre, antes del comienzo de la secreción tiroidea fetal. Parece, pues, que la alteración de la migración celular se relaciona con la hipotiroxinemia materna, y subsiguiente disminución de la T4 necesaria para la formación de T3 en diferentes regiones corticales del feto. Puede explicar el retraso irreversible del desarrollo psicomotor de niños de madres que no son clínicamente hipotiroideas, pero que tienen una T4 libre baja durante el 1º trimestre.

El embrión humano dispone de concentraciones de T4 libre (FT4) similares a las del adulto.

(Rosa Calvo, Bernard Contempré (Universidad Libre de Bruselas, Bélgica), Eric Jauniaux, M. Asunción, S. Durán, M. J. Presas, G. Morreale de Escobar.)

Habíamos demostrado la presencia de T4 en el líquido celómico que baña al embrión humano durante el primer trimestre de gestación, fase de desarrollo muy anterior al comienzo de la función tiroidea del feto. Las concentraciones totales de T4 están relacionadas con los niveles séricos de T4 en la circulación materna. Son una 150 veces más bajas en el líquido celómico y, aún más, en el amniótico, que en la circulación materna. También lo son las concentraciones de proteínas que ligan las hormonas tiroideas, por lo que resultaba muy interesante determinar el porcentaje de T4 en forma "libre", no ligada a proteínas. Se considera que es esta forma "libre" de la T4 la que puede entrar en las células y dar lugar en estas a la formación regulada de la forma hormonal activa, la tri-yodo-tironina (T3). Se encontró, por diferentes métodos analíticos, que las concentraciones de T4 "libre" en el líquido celómico y en el amniótico son muy parecidas a las circulantes en la madre, a pesar de la gran diferencia que se había encontrado en las concentraciones de T4 total. Ambos líquidos están en contacto directo con el embrión, por lo que se deduce que las concentraciones de T4 disponibles para los tejidos embrionarios no son mucho más bajas que en el adulto, sino del mismo orden de magnitud que las que desencadenan efectos biológicos. Las concentraciones de T4 encontradas en líquido celómico y amniótico están muy lejos de saturar la capacidad de ligazón de las diferentes proteínas que se encuentran en dichos líquidos, por lo que la concentración de FT4 se afectaría cuando la FT4 circulante de la madre es baja (hipotiroxinemia). Este hallazgo explicaría los efectos negativos en el desarrollo embrionario relacionados con una hipotiroxinemia materna padecida en el primer trimestre.

Deficiencia de yodo en niños prematuros

(S. Ares, G. Morreale de Escobar, F. Escobar del Rey, S. Durán, M.J.Presas)

Los estudios realizados en años anteriores en prematuros ingresados en el Servicio de Neonatología de La Paz (Dr. J. Quero) pusieron claramente de manifiesto que éstos niños tienen niveles muy bajos de tiroxina sérica libre (FT4), comparada con la de neonatos a término. Los niveles de FT4 de los prematuros son muy inferiores a los que les correspondería tener fisiológicamente, o sea, de seguir desarrollándose *in utero*. Asimismo, también lo son las concentraciones circulantes de la hormona estimuladora del tiroides (TSH). Estos resultados demuestran que con el nacimiento prematuro se interrumpen importantes aportaciones maternas de T4 y de TRH placentario que protegen al feto de su inmadurez hipotálamo-hipófisis-tiroidea. Por tanto, los recién nacidos prematuros tienen que hacer frente a los elevados requerimientos hormonales del organismo cuando su glándula tiroides aún no ha madurado adecuadamente. Varios estudios recientes han demostrado que el grado de hipotiroxinemia neonatal de los prematuros se correlaciona causalmente con un peor desarrollo mental y un aumento del riesgo de padecer parálisis cerebral.

Nosotros hemos demostrado en nuestro estudio que el grado de hipotiroxinemia de los prematuros no sólo depende de su edad gestacional, sino también de la cantidad de yodo que ingieren después de nacer, insuficiente en la mayoría de las fórmulas usadas para su

alimentación.

Numerosas casas comerciales, conocedoras de este hallazgo, han aumentado el contenido en yodo de sus productos. Hemos realizado determinaciones del contenido en yodo de una serie importante de ellos. Aunque hay una notable mejoría, son sin embargo muy pocos los preparados que cumplen con las recomendaciones actuales. Se ha iniciado un nuevo estudio en prematuros, para comprobar hasta qué punto esta mejoría de la ingesta de yodo de ha podido disminuir el grado de su hipotiroxinemia.

Efectos de la hormona liberadora de tiotropina (TRH) y glucocorticoides, suministrados a la madre, sobre el estado tiroideo materno y fetal: su efecto en la maduración pulmonar.

(S. Candelas, J. Tovar, J. Diaz-Pardo, G. Morreale de Escobar, S. Durán, M.J. Presas)

La administración, a los 10 días de gestación, de una sola dosis del herbicida nitrofen (2-4-diclorofenil-p-nitrofenil eter) a ratas se usa para obtener un modelo experimental de la hipoplasia pulmonar congénita. En varias publicaciones se había propuesto que esto podría ser consecuencia de una interferencia en el metabolismo de las hormonas tiroideas, tan importante para la maduración pulmonar, tanto en el hombre como la rata. Asimismo, otros autores han encontrado que la administración de TRH y glucocorticoides a la rata preñada tratada con nitrofen contrarrestaba los efectos de este herbicida sobre la maduración pulmonar. Se está investigando el mecanismo por el cual esto ocurre. Una de las primeras posibilidades a testar es que la administración de TRH a la madre aumenta las concentraciones de hormonas tiroideas asequibles al feto, contrarrestando con ello la disminución de las concentraciones de hormonas tiroideas en el pulmón fetal. Se está testando esta hipótesis, midiendo concentraciones de T4 y T3 en plasma y tejidos maternos y fetales a distintas edades gestacionales, en ratas normales y las tratadas con nitrofen, con y sin tratamiento con TRH sólo, glucocorticoides sólo, o ambos.

Hasta ahora se ha encontrado que el tratamiento materno con TRH, glucocorticoides, o ambos combinados, afecta las concentraciones de T4 y T3 en tejidos maternos, pero apenas afecta a las que se encuentran en los tejidos fetales.

Publicaciones

Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1998). Iodación universal de la Sal: un derecho humano de la infancia. *Endocrinología* 45, 3-16.

Morreale de Escobar, G., Ares, S. (1998). The hypothyroxinemia of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 713-715.

Obregón, M.J., Calvo, R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1998). Thyroid hormone and fetal development. En: *The Thyroid and Age* (Pinchera. A., Mann, K., Hostaleck, U., eds). Schattauer, Stuttgart, pp 49-73.

Schroder-van der Elst, J.P., van der Heide, D., Rokos, H., Morreale de Escobar, G., Kohrle, J. (1998). Synthetic flavonoids cross the placenta in the rat and are found in fetal brain. *Am. J. Physiol.* 274, E253-256.

Schröder-van der Elst, J.P., van der Heide, D., Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J. (1998). Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: A role for the skin in 3,5,3'-triiodothyronine economy? *Endocrinology* 139, 2229-2234.

Calvo, R., Roda, J.M., Obregon, M.J., Morreale de Escobar, G. (1998). Thyroid hormones in human tumoral and normal nervous tissues. *Brain Res.* 801, 150-157.

Calvo, R., Forcen, R., Obregon, M.J., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Regadera, J. (1998). Immunohistochemical and morphometric studies of the fetal pancreas in diabetic pregnant rats. Effects of insulin administration. *Anat. Rec.* 251, 173-180.

- Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1998). Deficiencia de yodo y Derechos de la Infancia. An. R. Acad. Nac. Med. 115, 683-701.
- Escobar-Morreale, H.F., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1998). Fisiología del Tiroides. En : Actualizaciones en Endocrinología-5: Tiroides (Diéguez González, C, Pavía Sesma, C., Yturriaga Matarranz, R., eds), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 1-40.
- Ares, S., Morreale de Escobar, G., Quero, J. (1998). Alteraciones Tiroideas neonatales. En : Actualizaciones en Endocrinología-5: Tiroides Diéguez González, C, Pavía Sesma, C., Yturriaga Matarranz, R., eds), McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 105-132.
- Escobar-Morreale, H.F., Obregon, M.J., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1999). Tissue-specific patterns of changes in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine concentrations in thyroidectomized rats infused with increasing doses of the hormone. Which are the regulatory mechanisms? Biochimie 81, 453-462.
- Morreale de Escobar, G. (1999). Interrelaciones materno-fetales de las hormonas tiroideas. An. Esp. Pediatr. 50 Suppl 125,36-43.
- Ares, S., Morreale de Escobar, G., Quero, J. (1999). Lactancia artificial y deficiencia de yodo en el niño prematuro. An. Esp. Pediatr. 50 Suppl 125, 47-51.
- Casanova, M.L., Bravo, A., Ramirez, A., Morreale de Escobar, G., Were, F., Merlino, G., Vidal, M., Jorcano, J.L. (1999). Exocrine pancreatic disorders in transgenic mice expressing human keratin 8. J. Clin. Invest. 103, 1587-1595.
- Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. N. Engl. J. Med. 341, 2015-2016 (letter to editor).
- Escobar-Morreale, H.F., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1999). La Glándula Tiroides. En: Fisiología Humana (Tresguerres, J.A.F., ed). 2a edición, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 902-930.

Premios

Premio Rey Jaime I de Medicina Clínica, 1998.

Tesis Doctorales

Javier de Santiago García

Ingesta de yodo durante el embarazo y su repercusión sobre la función tiroidea. Efectos de la suplementación. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 1999. Directora: Gabriela Morreale de Escobar. Calificación: Sobresaliente Cum Laude

Biología de los receptores hormonales nucleares: efectos en cerebro y cáncer

Investigador Principal:	Muñoz, Alberto, Profesor de Investigación del CSIC
Investigadores Asociados:	Jiménez, Benilde, Profesor Asociado UAM
Becarios Postdoctorales:	Alvarez, Manuel García, Luis Francisco González, M ^a Victoria González, José Manuel
Becarios Predoctorales:	Cuadrado, Ana Figueroa, Angélica García, Héctor Navarro, Cristina Tenbaum, Stephan
Colaboraciones:	Bernal, Juan, IIB Bonilla, Félix, Clínica Puerta de Hierro, Madrid Soriano, Eduardo, Universidad de Barcelona Lafarga, Miguel, Universidad de Cantabria Caelles, Carme, Universidad de Barcelona García de Herreros, Antonio, Universidad Pompeu Fabra Baniahmad, Aria, Univ. de Giessen, Alemania Urade, Yoshihiro, Osaka Bioscience Institute, Osaka Renau, Jaime, Centro de Investigación La Fe, Valencia Bouck, Noel, Northwestern University, Chicago Zenke, Martin, Max-Delbrück Center, Berlín
Personal de Apoyo	González, Margarita Martínez, M ^a Teresa

Palabras Clave

Receptores nucleares, cerebro, cáncer, regulación génica, hormona tiroidea, erbA

Identificación y estudio de genes regulados por hormona tiroidea en el cerebro

(M. Alvarez, A. Cuadrado, C. Navarro, A. Figueroa, A. Muñoz, en colaboración con J. Bernal del IIB, E. Soriano de la Universidad de Barcelona y M. Zenke del Max-Delbrück Center de Berlín)

Mediante PCR diferencial hemos identificado nuevos genes de cerebro regulados por hormona tiroidea. Entre ellos se encuentra un homólogo del gen fúngico Tom70, que codifica un componente del complejo de la translocasa mitocondrial implicado en el transporte intramitocondrial de proteínas desde el citoplasma. Se ha podido identificar también a partir de cultivos de células neuroblásticas embrionarias el homólogo del gen de *Drosophila* SWAP ("*Suppressor of white-apricot*"), que codifica un regulador del splicing. La deficiencia de hormona tiroidea causa un aumento de la expresión de ambos genes en regiones específicas del sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo en la rata. Por otra parte, a la vista de las graves alteraciones en la migración neuronal que tienen lugar en el cerebro hipotiroideo, hemos estudiado la expresión de *reelin*, gen que codifica una proteína de matriz extracelular implicada en el control de este proceso. Nuestros resultados indican que la hormona tiroidea regula positivamente los niveles de mRNA y de proteína Reelina durante el desarrollo cerebral temprano en la rata. De acuerdo a lo descrito en ratones *reeler* que carecen de este gen, la menor expresión de Reelina en el cerebro hipotiroideo se acompaña de un aumento de la expresión de

Dab1, una proteína adaptadora que parece estar implicada en la vía de señalización de Reelina. Otros genes actualmente en estudio codifican proteasas o inhibidores de éstas que exhiben una expresión específica en el SNC.

Estudio de la regulación hormonal del gen de la prostaglandina D2 sintasa de cerebro

(L. F. García y A. Muñoz, en colaboración con Y. Urade del Osaka Bioscience Institute)

Hemos continuado el estudio del gen L-PGDS, que codifica por la forma de tipo lipocalina de la prostaglandina D2 sintasa, previamente caracterizado por nosotros como regulado por hormona tiroidea en el cerebro de rata. La L-PGDS es una proteína bifuncional muy abundante en el líquido cefalorraquídeo. Tiene actividad enzimática (responsable de la síntesis de PGD2 a partir de PGH2), y, además, es capaz de transportar moléculas hidrofóbicas como diversos retinoides. Su sustrato, la PGD2, interviene en la regulación de múltiples e importantes funciones en el SNC tales como la temperatura corporal, el ciclo vigilia-sueño y las respuestas al dolor y al olor. Mediante co-inmunoprecipitación hemos identificado una secuencia de unión del receptor de hormona tiroidea (TR) en la región promotora del gen L-PGDS, que media la regulación por dicha hormona en células transitoriamente transfectadas. Sin embargo, este elemento no es funcional en el contexto del promotor natural. Asimismo, recientemente hemos demostrado que el gen L-PGDS es fuertemente estimulado por glucocorticoides, y que la adición de hormona tiroidea potencia el efecto del glucocorticoide sintético dexametasona. El tratamiento con dexametasona induce transcripcionalmente la expresión del gen L-PGDS en neuronas hipotalámicas en cultivo, causando un aumento en los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática. Actualmente estamos analizando los efectos aditivos y/o sinérgicos de ambas hormonas, así como realizando un estudio detallado del promotor para identificar la existencia de elementos de respuesta a glucocorticoides y su relación con el elemento de unión a TR.

Efecto de hormonas sobre la actividad de proteínas quinasas intracelulares en células endoteliales y epiteliales

(M.V. González, B. Jiménez, J.M. González y A. Muñoz, en colaboración con M.T. Berciano y M. Lafarga de la Universidad de Cantabria y C. Caelles de la Universidad de Barcelona)

Continuando los estudios que nos permitieron identificar a la JNK ("c-Jun N-terminal kinase") como una diana de inhibición por glucocorticoides, hormona tiroidea, ácido retinoico y vitamina D en diversos tipos de células (Caelles et al., *Genes & Dev.*, 11, 3351-3364, 1997), hemos estudiado los efectos de estas hormonas con receptores nucleares sobre la actividad de la JNK así como de la ERK ("Extracellular-Regulated Kinase") y la p38MAPK, enzimas implicadas en la transmisión de señales hacia el núcleo celular. Estos estudios se han llevado a cabo en células endoteliales humanas, de rata y de ratón. Se ha comprobado que la máxima actividad inhibitoria corresponde a glucocorticoides sobre la inducción de la JNK por el TNF- α , siendo también considerable la inhibición de la estimulación de la ERK por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), probablemente el más potente factor angiogénico conocido. El ácido retinoico y la vitamina D tienen efectos menores sobre estas enzimas. Por el contrario, ninguna de estas hormonas modula la actividad de la p38MAPK en células endoteliales, ni tampoco en las HeLa. Por otra parte, estamos investigando el mecanismo íntimo de este efecto inhibitorio de glucocorticoides sobre la JNK mediante técnicas de biología molecular y celular.

Biología del oncogén *v-erbA*. Efecto de los genes *v-erbA* y *c-erbA/TRA1* en células gliales y relación con co-represores transcripcionales

(S. Tenbaum y A. Muñoz, en colaboración con S. Llanos del ICRF de Londres, J. Renau del Centro de Investigación La Fe de Valencia y A. Baniahmad de la Universidad de Giessen)

En células gliales de ratón immortalizadas hemos observado que la sobre-expresión del

proto-oncogén *c-erbA* que codifica el receptor TRa1 causa una disminución de la proliferación. En ausencia de suero, sin embargo, *c-erbA/TRa1* induce la muerte celular por apoptosis por un mecanismo que es revertido por activación de PKC y sobre-expresión del gen *bcl-2*. Por el contrario, el oncogén *v-erbA* que codifica una forma mutada de *c-erbA/TRa1* induce la expresión de PDGF-B y como consecuencia la proliferación, invasividad y tumorigenicidad de estas células en ratones inmunodeficientes. Actualmente estamos investigando las mutaciones que son responsables de esta acción de *v-erbA*, así como la actividad biológica de una nueva isoforma natural de este oncogén recientemente aislada. Además, estudiamos la relación de *v-erbA* con Alien y otros co-represores transcripcionales.

Efectos de la hormona tiroidea y la vitamina D en células de epitelio de mama y de colon

(J.M. González, H. García y A. Muñoz, en colaboración con A. García de Herreros de la Universidad Pompeu Fabra, A. Cano y M. Quintanilla del IIB, F. Bonilla de la Clínica Puerta de Hierro, y Lise Binderup de Leo Pharmaceuticals, Dinamarca)

Se están analizando los efectos de la 1,25-dihidroxitamina D3, derivado activo de la vitamina D, y de varios análogos no hipercalcémicos (EB1089,...) sobre la capacidad proliferativa, la expresión génica, el fenotipo y la tumorigenicidad de células de epitelio de colon humano. Hemos identificado varios genes diana y cambios en el fenotipo que indican un efecto protector de estas moléculas sobre la transformación maligna de este tipo celular. Asimismo, continuando estudios previos estamos investigando los efectos de la hormona tiroidea en células de epitelio de mama, en las que hemos identificado la modulación de genes implicados en el control del ciclo celular y la adhesión intercelular (cateninas, fodrina, vinculina) y célula-sustrato (tenascina). Además, en colaboración con el grupo del Dr. F. Bonilla hemos iniciado el estudio de la integridad de los genes TRa y TRb en carcinomas de mama humanos.

Mecanismo de acción antiangiogénica de la trombospondina-1

(B. Jiménez, en colaboración con N. Bouck, de la Universidad de Chicago)

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. La trombospondina-1 (TSP-1) es un potente inhibidor natural del proceso de angiogénesis, cuyos niveles disminuyen durante la progresión tumoral. Nuestros estudios nos han permitido determinar que la capacidad antiangiogénica y antitumoral de la TSP-1 es consecuencia de su capacidad para inducir apoptosis de forma específica en las células endoteliales activadas. Utilizando distintos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo* hemos identificado varios de los elementos de señalización que median el efecto de este factor antiangiogénico: el receptor de membrana CD36, las proteínas quinasas Fyn y p38MAPK y la caspasa -3.

Publicaciones

Llanos, S., Caelles, C., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Fernández-Luna, J.L., Boscá, L. and Muñoz, A. (1998). The *c-erbA* proto-oncogene induces apoptosis in glial cells via a protein kinase C- and *bcl-2*- suppressible mechanism. *J. Neurochem.* 70, 2315-2326

Alvarez-Dolado, M., González-Sancho, J.M., Bernal J. and Muñoz, A. (1998). Developmental expression of tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. *Neuroscience* 84, 309-322.

García-Fernández, L.F., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J. and Muñoz, A. (1998). Identification of a thyroid hormone response element in the promoter region of the rat lipocalin-type prostaglandin D2 synthase gene (*b-trace*). *Mol. Brain Res.* 55, 321-330.

- González-Sancho, J.M., Alvarez-Dolado, M. and Muñoz, M. (1998). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits tenascin-C expression in mouse and human mammary epithelial cells. *FEBS Lett.* 426, 225-228.
- Casado, M., Martín, M., Muñoz, A. and Bernal, J. (1998). Vitamin D₃ inhibits proliferation and increases *c-myc* expression in fibroblasts from psoriatic patients. *J. Endocrinol. Invest.* 21, 520-525.
- Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jiménez, B., Mandriota, S. J., Borlat, F., Sim, B. K. L., Wu, Z., Grau, G. E., Shing, Y., Soff, G. A., Bouck, N., and Pepper, M. S. (1998). Angiostatin induces apoptosis and alters proteolytic properties in endothelial cells. *Blood* 92, 4730-4741.
- González-Sancho, J.M., Alvarez-Dolado, M., Caelles, C. and Muñoz, A. (1999). Thyroid hormone inhibits tenascin-C expression in mammary epithelial cells. *Mol. Carcinog.* 24, 99-107.
- Alvarez-Dolado, M. Ruiz, M., Del Río, J.A., Alcántara, S., Burgaya, F., Sheldon, M., Nakajima, K., Bernal, J., Howell, B.W., Curran, T., Soriano E. and Muñoz, A. (1999). Thyroid hormone regulates *reelin* and *dab1* expression during brain development. *J. Neurosci.* 19, 6979-6993.
- Caelles, C. and Muñoz, A. (1999). *Oncogenes Nucleares*. *Rev. Cáncer* 13, 27-40.
- Alvarez-Dolado, M., González-Sancho, J.M., Navarro-Yubero, C., García-Fernández L.F. and Muñoz, A. (1999). Retinoic Acid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells. *J. Neurosci. Res.* 58, 293-300.
- Cuadrado, A., Bernal, J. and Muñoz. (1999). Identification of the mammalian homolog of the splicing regulator *Suppressor-of-white-apricot* as a thyroid hormone regulated gene. *Mol. Brain Res.* 71, 332-340.
- González, M.V., González-Sancho, J.M., Caelles, C., Muñoz, A. and Jiménez, B. (1999). Hormone-activated nuclear receptors inhibit the stimulation of the JNK and ERK signalling pathways in endothelial cells. *FEBS Letters* 459, 272-276.
- Alvarez-Dolado, M., González-Moreno, M., Valencia, A., Zenke, M., Bernal, J. and Muñoz, A. (1999). Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone regulated gene in specific brain regions. *J Neurochem.* 73, 2240-2249.
- Gillis, P., U. Savla, O.V. Volpert, B. Jiménez, C.M. Waters, R.J. Panos and Bouck, N. (1999). Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J. Cell Sci.* 112, 2049-2057.

Patentes

García-Fernández L.F., Muñoz, A. et al.
 New macrolide compounds, new use of known and new macrolides. (1999).
 Applicant: Instituto Biomar S. A. N° de aplicación: 9915306.6 Países: Reino Unido

Tesis doctorales

José Manuel González Sancho

“Efecto de los genes *erbA* y la hormona tiroidea en células de epitelio de mama”.

Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1998. Director: Alberto Muñoz.

Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Regulación de los genes de las UCPs y de la actividad y expresión de las desiodasas en adipocitos marrones.

Investigador Principal:	Obregón, María Jesús, Investigador Científico
Investigadores Contratados:	Calvo, Rosa María (contrato MEC hasta marzo 1999) Schröder-van der Elst, Janny (Beca Marie Curie (E.C.) hasta julio 1998)
Investigadores Asociados:	Morreale, Gabriella, Profesor de Investigación <i>ad honorem</i> , y Contratada por el CSIC Escobar del Rey, Francisco, Profesor de Investigación, jubilado
Becarios Postdoctorales:	Martínez de Mena, Raquel (desde marzo 1999)
Becarios Predoctorales:	Martín, Eva (hasta abril 1999) Martínez de Mena, Raquel (hasta enero 1999) Medina, Gema Regidor, Natalia (desde septiembre 1999)
Personal de Apoyo	Hernández, Arturo (Universidad de Dartmouth, USA, en situación de permiso sin sueldo)
Colaboraciones:	van der Heide, Daan. Professor. Agricultural University. Wageningen, The Netherlands, Holanda, 1998. Alvarez, Laura, Becaria Predoctoral visitante, octubre 1999 Buenos Aires, Argentina

Palabras Clave

Tiroxina, T3, Triac, UCP, desiodasas, adipocitos marrones

Regulación de la expresión de UCP-1 y de su promotor génico en adipocitos marrones por norepinefrina, T3, ácido retinoico, insulina y glucocorticoides.

(Eva Martín, Raquel Martínez de Mena, Gema Medina, Rosa Calvo, Arturo Hernández y María Jesús Obregón)

El tejido adiposo marrón (BAT) en su estado activo, parece regular el gasto energético y por ello podría ser importante en la etiología de la obesidad. El principal mecanismo de activación termogénica del BAT es la inducción de la UCP-1, proteína mitocondrial que al desacoplar la fosforilación oxidativa produce calor, y es el marcador específico del BAT. Hemos estudiado los procesos de activación adrenérgica de la UCP-1 en cultivos primarios de adipocitos marrones de rata procedentes de células precursoras que diferencian a adipocitos maduros. El estudio es abordado desde diversos ángulos por varias personas del grupo.

Por estudios anteriores (A.H.) sabemos que la expresión del mRNA de UCP-1 se estimula por norepinefrina (NE) durante la fase de diferenciación y que la T3 es necesaria y potencia enormemente los efectos de la NE sobre el mRNA de UCP-1. Estos efectos son a nivel transcripcional y requieren síntesis de proteínas. Además la T3 estabiliza la vida media de los mRNA transcritos.

Se ha estudiado (E.M., A.H.) la regulación del mRNA de UCP-1 en dos especies (rata y ratón) encontrándose que su regulación por T3, NE, insulina y ácido retinoico es diferente en ambas especies, siendo mayores los requerimientos de T3 en la estimulación adrenérgica en cultivos de rata, y de insulina en cultivos procedentes de ratón.

También se ha estudiado la modulación de la activación adrenérgica del mRNA por

insulina (R.M.M.), hormona fundamental en el tejido adiposo, encontrándose que la insulina inhibe la estimulación del mRNA de UCP-1, tanto usando NE+T3 como T3. Estos datos muestran que la insulina tiene acciones contrapuestas sobre UCP-1 y D2, ya que inhibe la estimulación adrenérgica del mRNA de UCP-1, mientras que estimula la 5' desiodasa 2 (D2) (ver detrás). También se han estudiado los efectos de los glucocorticoides sobre el mRNA de UCP-1, observándose efectos bifásicos, dependiendo de la dosis empleada, día de diferenciación y tiempo de exposición a estas hormonas, siendo sus efectos estimuladores durante la diferenciación e inhibidores durante fases celulares más tempranas, además de inhibir la proliferación celular.

Se han continuado los estudios sobre el efecto del Triac (A.H., G.M.), un metabolito de la T3, confirmando que tiene mayor potencia termogénica que la T3 sobre el mRNA de UCP-1, actuando a dosis muy bajas. Los estudios se han completado analizando el uptake celular de Triac y T3 y cuantificando sus efectos sobre otros genes como las desiodasas.

Además se ha estudiado la activación del gen de la UCP-1 a nivel de promotor (E.M., R.C.). Tras clonar el promotor de la UCP-1, aislando distintas porciones del extremo 5' terminal hasta -6.0 kb, se ha estudiado su regulación usando transfecciones transitorias en cultivos primarios de rata, tras la validación de este sistema. La expresión basal es máxima usando el promotor basal. Se ha estudiado la regulación del "enhancer" TRE (-2493/-2253), ligado al promotor basal de la UCP-1, usando NE, T3, ácido retinoico y glucocorticoides y la acción de la insulina sobre estos efectores. El elemento TRE induce una respuesta adrenérgica máxima y se comporta como un elemento de respuesta a hormonas tiroideas, y no a ácido retinoico, potenciando la acción de la NE. La insulina regula negativamente el TRE. Los glucocorticoides tienen una acción inhibitoria de la transcripción de UCP-1 en estadios tempranos, y su acción es estimuladora durante la fase de diferenciación. También se ha estudiado la expresión de los receptores nucleares RXR y PPAR gamma.

Regulación de los genes de la UCP-2 y 3 en adipocitos marrones por noradrenalina, hormonas tiroideas, Triac, insulina y leptina.

(Gema Medina, Rosa Calvo y María Jesús Obregón)

En 1997 se clonaron una familia de proteínas homólogas a la UCP-1 (UCP-2 y UCP-3), con una alta expresión en distintos tejidos, que parecen estar involucradas en el control de la termogénesis a nivel del músculo esquelético y otros órganos. Hemos obtenido sus cDNA por RT-PCR, así como el clonaje del promotor de la UCP-3 de rata y se ha comenzado el estudio de la regulación de sus mRNAs en cultivos primarios de adipocitos marrones (R.C., G.M.). Observamos claros efectos estimuladores de la T3 y el Triac sobre el mRNA de UCP-2 en adipocitos marrones, tanto solos como conjuntamente con NE. El Triac se comporta como un agente termogénico. La insulina tiene efectos inhibidores sobre estos estímulos. Todavía no podemos decir que la leptina tiene un papel como inductora de UCP-2, ya que en nuestros cultivos no produce inducciones.

Estos estudios se han completado con estudios *in vivo*, usando ratas infundidas con distintas dosis de Triac o T3 (R.C., G.M., M.J.O.), confirmando la mayor potencia termogénica del Triac en BAT. Intentamos validar un método para determinar las concentraciones de Triac en distintos tejidos de rata y determinando otros parámetros biológicos (TSH) que se afectan en esta situación.

Además, se ha caracterizado el promotor basal de la UCP-3 (R.C.) identificándose sus elementos básicos y el inicio de transcripción, así como su actividad en varios sistemas de cultivo celular.

Regulación de la actividad y mRNA de la 5' Desiodasa 2 (D2) en adipocitos marrones en cultivo

(Raquel Martínez y María Jesús Obregón)

La T3 necesaria para la activación del BAT es producida localmente en el adipocito marrón por la 5' Desiodasa tipo II (D2). Hemos estudiado la regulación de dicha actividad D2 en los cultivos arriba descritos, por un ser un factor determinante en la producción de la T3 necesaria

para la actividad termogénica. La actividad D2 se estimula por NE, vía receptores β 3-adrenérgicos. La D2 se inhibe por T4, mientras que la T3 es requerida y potencia enormemente su activación adrenérgica y ésta acción de la T3 es similar a la producida sobre el mRNA de UCP-1. El efecto de la T3 sobre la NE es más importante en células totalmente diferenciadas y no parece estar mediado por aumentos del cAMP.

Se ha estudiado el papel de la insulina, que parece ser necesaria para la actividad D2, siendo su efecto directo, y no mediado a través de los receptores de IGFs. El efecto de la insulina sugiere que la activación requiere la vía MAPK.

Las desiodasas (D2 y D3) fueron clonadas en 1995 como selenoproteínas. Ello nos ha permitido analizar la regulación de sus mRNAs. Hemos analizado los efectos de la NE y T3 sobre el mRNA de la D2. La NE *per se* no estimula el mRNA de la D2, y para ser efectiva requiere la presencia de T3. La T3 *per se*, induce pequeños aumentos en el mRNA de D2. La insulina tiene efectos estimuladores sobre el mRNA de D2 en días tempranos, mientras que durante la diferenciación inhibe su expresión.

Regulación de la actividad 5'Desiodasa en tejidos de rata por hormonas tiroideas

(Rosa Maria Calvo, María Jesús Obregón, en colaboración con el grupo de la Dra G. Morreale)

Se han proseguido estudios sobre la regulación de las concentraciones de hormonas tiroideas y de las actividades desiodasas en tejidos fetales y adultos de rata. Se han explorado situaciones de deficiencia de iodo, así como otras situaciones que influyen en el eje tiroideo, como la diabetes y la subnutrición. (Ver líneas de investigación Dra G. Morreale)

Se citan brevemente las líneas de investigación y situaciones experimentales donde se ha explorado la regulación de las desiodasas D1, D2 y D3 por hormonas tiroideas o insulina:

1. Efecto de la deficiencia de iodo sobre las desiodasas cerebrales, hepáticas, tiroideas e hipofisarias. Estudio del suplemento progresivo de iodo. Exploración de los efectos de la deficiencia en iodo sobre las desiodasas en otros tejidos.

2. Efecto de la deficiencia en iodo sobre la actividad D2 durante el desarrollo de la cóclea y del oído interno durante la fase postnatal.

3. Estudio del transportador de iodo (NIS) en situaciones de deficiencia de iodo en tiroides fetales y su posible presencia en otros tejidos fetales, como placenta, piel y estómago. En este modelo de deficiencia de iodo se realizó un estudio completo del perfil de las desiodasas D1, D2 y D3 en piel, BAT, cerebro, hígado, placentas, etc (en colaboración con el grupo de los Dres. Daan van der Heide y Janny Schröder-van der Elst, Wageningen, Holanda).

4. Efecto de la subnutrición y diabetes sobre las desiodasas hipotalámicas e hipofisarias durante el desarrollo de la rata. (en colaboración con el grupo de la Dra A.M. Pascual-Leone, Centro Mixto CSIC- Fac. Farmacia. Universidad Complutense).

5. Efecto del HCB (dioxinas) sobre las desiodasas y las concentraciones de hormonas tiroideas de BAT, hígado, riñón y tiroides (colaboración con el grupo de la Dra D. Kleiman y la Lda L. Alvarez, Buenos Aires, Argentina).

Publicaciones

Calvo, R., Forcén, R., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. and Regadera, J. (1998) Immunohistochemical and morphometric studies of the fetal pancreas in diabetic pregnant rats. Effects of insulin administration. *The Anatomical Record* 251, 173-180

Calvo, R., Roda, J.M., Obregón, M.J. and Morreale de Escobar, G. (1998) Thyroid hormones in human tumoral and normal nervous. *Brain Research* 801, 150-157

Hernández, A., St Germain, D. and Obregón, M.J. (1998) Transcriptional activation of type III inner ring deiodinase by growth factors in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology* 139, 634-639

Obregón, M.J., Calvo, R.M., Escobar del Rey, F. and Morreale de Escobar, G. (1998) Thyroid

hormones and fetal development. En: "Thyroid and Age" (Pinchera, A., Mann, K., Hostalek, U., eds.). Schattauer, Stuttgart, pp 49-73

Schröder-van der Elst, J.P., van der Heide, D., Morreale de Escobar, G. and Obregón, M.J. (1998) Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: a role for the skin in T3 economy? *Endocrinology* 139, 2229-2234

Barroso, I., Benito, B., García-Jiménez, C., Hernández, A., Obregón, M.J. and Santisteban, P. (1999) Norepinephrine, triiodothyronine and insulin up-regulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene during brown adipocyte differentiation. *European Journal of Endocrinology* 141, 169-179

Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. and Morreale de Escobar, G. (1999) Tissue-specific patterns of changes in 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine concentrations in thyroidectomized rats infused with increasing doses of the hormone. Which are the regulatory mechanisms? *Biochimie* 81, 453-462

Obregón, M.J. (1999) Tejido adiposo: Termogénesis. En: "Obesidad, la epidemia del siglo XXI" (Moreno, B., Monereo, S., Alvarez, J., eds.). Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A., Madrid, pp 39-58

Tesis doctorales

Raquel Martínez de Mena

"Regulación de la activación termogénica en adipocitos marrones en cultivo. Estudio de la UCP y la 5'Desiodasa II". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 1999. Directora: María Jesús Obregón Perea. Calificación: Sobresaliente "cum laude"

Eva Martín Molina

"Regulación hormonal del promotor de la UCP-1 en adipocitos marrones". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 1999. Directora: María Jesús Obregón Perea. Calificación: Sobresaliente "cum laude"

Transducción de señales y mecanismos transcripcionales implicados en el control del crecimiento y la diferenciación celular: Papel de factores de transcripción específicos de tejido.

Investigador Principal:	Santisteban, Pilar, Investigador Científico
Investigadores Contratados:	Velasco, Juan Angel (hasta septiembre 98)
Personal de Apoyo	Seisdedos, Maria Teresa
Becarios Postdoctorales:	García, Bibian Barroso, Isabel (desde octubre 1999)
Becarios Predoctorales:	Ortiz, Lourdes (hasta Abril 1998) Barroso, Isabel (hasta octubre 1999) Medina, Diego L. Losada, Alejandro Dilla, Tatiana Rivas, Marcos (desde Mayo 1998) Cuesta, Isabel (desde Septiembre 1998)
Colaboraciones:	Di Lauro, Roberto (Stazione Zoologica A. Dohrn, Nápoles, Italia) Cato, Andrew (Genetik Institut, Forschungszentrum Karlsruhe, Alemania) Tobar, Juan A (Servicio Cirugía Pediátrica, Hospital La Paz, Madrid)

Palabras Clave

Expresión génica, Transducción de señales, Transcripción, Diferenciación, Ciclo celular. Cancer.

Regulación hormonal de la expresión de genes específicos de tiroides:

1) Transportador de Iodo (NIS, Na⁺/I⁻ Symporter)

(B. García y P. Santisteban)

Tres de los genes específicos de tiroides y marcadores del fenotipo tiroideo diferenciado son los genes Tiroglobulina (Tg), Tiroperoxidasa (TPO) y el transportador de Iodo (NIS). Los tres genes son decisivos en la síntesis de las hormonas tiroideas. Estas son hormonas iodadas y por tanto es necesario que exista un riguroso control del gen responsable del transporte de iodo (NIS) al interior de la célula epitelial tiroidea. Por ello estamos estudiando la regulación a nivel transcripcional de NIS por los principales ligandos reguladores de la función tiroidea: la tirotropina TSH, la insulina y el IGF-I. TSH aumenta la expresión de NIS, y a diferencia de lo que ocurre para Tg y TPO ni insulina ni IGF-I tienen efecto alguno. Sin embargo, ambos ligandos inhiben de una forma dependiente de dosis la expresión de NIS inducida por TSH. El efecto de la TSH es mediado por AMPc ya que es reproducido por forskolina. El inhibidor de PKA, H89, reduce el estímulo de TSH pero también a diferencia de lo que ocurre para Tg y TPO no lo anula totalmente. Ello sugiere una regulación dependiente y otra independiente de PKA del gen NIS. Actualmente estamos estudiando la regulación del promotor de NIS. En la región más proximal se ha identificado un elemento de respuesta a TSH pero no a AMPc. En una región distal se ha identificado un enhancer (NUE = Nis Upstream Enhancer) que posee sitios de unión para dos factores de transcripción específicos de tiroides TTF-1 y Pax-8 (que definiremos más adelante) así como una secuencia de respuesta a AMPc (CRE-like). Este

elemento NUE responde fuertemente a TSH/AMPc. Nosotros estamos intentando localizar regiones en el promotor de NIS que respondan a insulina/IGF-I, y que inhiban la activación transcripcional ejercida a través del elemento NUE por TSH.

2) Papel del factor de transcripción específico *fork head* TTF-2 y del factor constitutivo CTF/NF-1

(L. Ortiz, M.T. Seisdedos, I. Cuesta y P. Santisteban)

Los promotores de los genes Tg y TPO están muy bien caracterizado. En ambos se unen tanto factores de transcripción específicos de tejidos (TTF-1, TTF-2 y Pax-8) como factores constitutivos (CTF/NF-1). Trabajos previos de nuestro laboratorio habían indicado que el factor de transcripción TTF-2, de la familia *fork-head*, media la respuesta hormonal de ambos genes. TTF-2 se une a un elemento en *cis* en ambos promotores al que hemos definido como un elemento de respuesta a hormonas. Sin embargo para que el factor TTF-2 sea activo transcripcionalmente necesita interactuar con otros factores. Por ensayos de interacción proteína-proteína hemos demostrado que TTF-2 interactúa con el factor constitutivo CTF/NF-1. Así mismo mediante estudios de *foot-printing* genómico hemos podido demostrar que para que el gen TPO se transcriba es necesaria la interacción estereoespecífica de ambos factores.

Dado que ambos factores son necesarios para la regulación hormonal tiroidea, nos hemos centrado en el estudio de su regulación hormonal. Los resultados obtenidos indican que la expresión tanto de TTF-2 como de CTF/NF-1 está regulada por TSH, vía AMPc, así como por insulina e IGF-I. Los genes específicos de tiroides Tg y TPO son a su vez antígenos tiroideos que juegan un papel decisivo en procesos de autoinmunidad tiroidea. Estamos estudiando la participación del factor TTF-2 en este proceso, habiendo demostrado que interleuquina-1 (IL-1) y el interferón (IF)- γ (factores usados en el tratamiento de pacientes con autoinmunidad tiroidea) disminuyen la expresión del antígeno tiroideo TPO. Este efecto tiene lugar a nivel transcripcional ya que en ensayos de transfección transitoria hemos demostrado que la actividad del promotor TPO disminuye tras tratamiento con IF γ e IL-1. Lo más interesante es que de nuevo el elemento en *cis* que media la respuesta a IF γ e IL-1 es el elemento de unión a TTF-2. Así mismo la expresión de este factor de transcripción disminuye tras el tratamiento con IF γ e IL-1, indicando su participación directa en los citados proceso de autoinmunidad tiroidea.

En colaboración con el grupo del Dr. Roberto Di Lauro, se ha caracterizado el promotor de TTF-2. Dada la participación decisiva de este factor en la regulación hormonal tiroidea, en nuestro laboratorio estamos identificando los elementos en *cis* y en *trans*, en dicho promotor que medien las anteriores respuestas a TSH, cAMP, insulina, IGF-I, IF γ e IL-1. Así mismo estamos estudiando el sistema de traducción de señales implicadas en la anterior regulación.

3) Reordenamiento de cromatina y control transcripcional.

(I. Cuesta y P. Santisteban)

El objetivo principal de este proyecto es el entendimiento de como factores de transcripción que se unen a secuencias específicas del DNA regulan la estructura de la cromatina, y por lo tanto controlan la capacidad transcripcional de sus genes diana. Este proyecto surge como consecuencia del hecho de que factores de la familia *forkhead* sean candidatos a reguladores de la estructura altamente ordenada de la cromatina. Estos factores de transcripción tienen similitud estructural con histonas *linker*, las cuales se unen a nucleosomas y compactan la cromatina. Este proyecto se ha iniciado recientemente en nuestro grupo. Los estudios que estamos realizando tienen como objetivo investigar los mecanismos por los cuales el factor TTF-2, un miembro de la familia *forkhead*, regula la estructura y la capacidad transcripcional de substratos cromatínicos artificiales *in vitro*. Pretendemos estudiar la homología estructural entre TTF-2 e histonas *linker* y como TTF-2 es capaz de descompactar estructuras cromatínicas. Estudiaremos este procesos en diferentes situaciones experimentales en células tiroideas normales y transformadas.

Control de la proliferación celular tiroidea.

1) Transducción de señales y ciclo celular en células epiteliales tiroideas.

(D.L. Medina y P. Santisteban)

El tiroides está compuesto de dos tipos celulares bien diferenciados: células epiteliales (o foliculares), que expresan Tg, TPO y NIS y células parafoliculares que expresan calcitonina.

Las células epiteliales son el componente mayoritario y su proliferación está regulada principalmente por la hormona TSH, que en estas células está considerada como un factor de crecimiento. Recientemente hemos descrito la existencia de un bucle de regulación autocrina en células epiteliales tiroideas de rata FRTL-5, en el que participan la TSH y el inhibidor general de la proliferación somatostatina (SS). Profundizando en los mecanismos implicados en este proceso hemos demostrado que la TSH disminuye los niveles del inhibidor de quinasa dependientes de ciclina p27^{kip1}, aumenta la expresión del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA-Red), el enzima limitante en la síntesis de colesterol y derivados isoprenoides, y aumenta la traslocación a la membrana de la proteína GTPasa RhoA. En cuanto a los genes importantes en la progresión a través del ciclo celular, la TSH incrementa los niveles de la ciclinas típicas de la fase G1 (D1 Y E), así como los niveles de la quinasas dependiente de ciclina CDK2. Estos incrementos se complementan con un aumento de la formación de los complejos ciclina E-CDK2 activos.

Por el contrario la SS inhibe la disminución de p27^{kip1}, mediada por la TSH, y disminuye la formación de complejos ciclina E-CDK2 activos. Utilizando inhibidores específicos de las distintas vías de señalización, y/o dominantes negativos de las diferentes quinasas implicadas, hemos podido demostrar que la proliferación de células epiteliales tiroideas mediada por TSH se produce a través de al menos dos vías en las que participan la PKA y la PI3K. Ambas rutas activan la síntesis de isoprenoides, necesarios para la traslocación de RhoA a la membrana plasmática. Al mismo tiempo, TSH incrementa la expresión de ciclinas esenciales para la transición G1/S y de la CDK2. La SS bloquea estos efectos mucho más arriba de la activación de las vías de la PKA y la PI3K, inactivando la adenilato ciclasa.

2) Control del ciclo celular en células parafoliculares tiroideas

(T. Dilla, J.A. Velasco, Medina D.L. y P. Santisteban)

En este estudio estamos utilizando un modelo de células parafoliculares derivadas de un carcinoma medular de tiroides (células MTT). Datos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que estas células son deficientes en p53. Basados en las observaciones de que la oncoproteína MDM2 inhibe la parada del ciclo celular y la apoptosis inducida por p53 y que induce el ciclo celular en ausencia de p53, nos propusimos estudiar el papel de MDM2 en las células MTT. En primer lugar comprobamos que el oncogen *mdm2* está ausente en dichas células y mediante transfección estable generamos líneas de células MTT expresando MDM2. Las líneas generadas presentaron un retardo en el crecimiento, demostrándose por citometría de flujo una población de células en estado hipodiploide lo que sugería una nueva función para MDM2 como inductor de apoptosis. Esta circunstancia se ha demostrado en más detalle mediante marcaje con anexina V y formación de la escalera de DNA. Comprobamos también, mediante inyección de las células generadas en ratones desnudos, que MDM2 no revierte el fenotipo tumoral, aunque cuando analizamos el porcentaje de células apoptóticas en los tumores con la técnica de TUNEL el número de núcleos apoptóticos era 20 veces superior en los tumores que sobreexpresaban MDM2. En la búsqueda de posibles rutas implicadas en la apoptosis mediada por MDM2 hemos demostrado que produce una disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica bcl-2 y un aumento en los de caspasa 2. Actualmente continuamos caracterizando otras proteínas implicadas en la respuesta apoptótica inducida por MDM2 en las células MTT, así como la implicación de esta oncoproteína en carcinomas medulares tiroideos humanos.

Regulación de la expresión de genes específicos de pulmón:

1) Expresión de las proteínas surfactante de pulmón y del factor de transcripción

homeotico TTF-1: Papel de glucocorticoides y antioxidantes

(A., Losada, J.A. Tovar y P. Santisteban)

El factor de transcripción homeótico TTF-1, identificado inicialmente en tiroides, se expresa también en pulmón y se ha definido como un factor esencial tanto para el desarrollo morfológico de éste órgano como para su maduración bioquímica ya que regula la expresión de las proteínas surfactantes de pulmón. Utilizando un modelo animal de hipoplasia pulmonar, inducida por el herbicida nitrofen, hemos demostrado la existencia de una marcada disminución de la expresión de TTF-1. Esta disminución es paralela a la de la expresión de la proteína B del surfactante pulmonar. Además hemos conseguido revertir la disminución de la expresión tanto de TTF-1 como de SP-B al tratar con glucocorticoides a los animales que sufren hipoplasia pulmonar. Por otro lado y teniendo en cuenta la mejora en el desarrollo pulmonar que sufren estos animales cuando se les administra antioxidantes como vitamina E, hemos estudiado la posible regulación redox que el nitrofen ejerce sobre TTF-1, llegando a la conclusión de que este compuesto actúa como un oxidante en ensayos *in vitro*, oxidando TTF-1 e impidiendo en parte la unión de este factor de transcripción a sus elementos en *cis* en el promotor de SP-B. En cuanto al mecanismo de acción de los corticoides estamos estudiando en nuestro modelo la implicación del complejo AP-1 y de la inhibición de su activación por corticoides.

2) Expresión diferencial de TTF-1 en pulmón y en tiroides.

(M. Rivas y P. Santisteban)

Como hemos venido exponiendo a lo largo de esta memoria, el factor homeótico TTF-1 se expresa en dos órganos diferentes, el tiroides y el pulmón. La pregunta que surge es: ¿Como un factor de transcripción específico de tejido tiroideo, controla la expresión de proteínas específicas de otro tejido (el pulmonar) que no expresa ningún fenotipo tiroideo? Para resolver esta pregunta hemos iniciado recientemente un proyecto nuevo en el que el primer objetivo que nos hemos planteados es estudiar el papel de TTF-1 en la regulación de los promotores de Tg y de SP-B. En una primera aproximación estamos estudiando si en células pulmonares (H441) que contienen TTF-1 somos capaces de expresar exogenamente el promotor de Tg y viceversa: si en células tiroideas (FRTL-5) que también expresan TTF-1 somos capaces de expresar el promotor de SP-B. Estos resultados nos indicarían si el problema de la expresión diferencial de ambos genes (Tg y SP-B) es la abundancia relativa de TTF-1 en ambos tejidos. Otro problema que estamos abordando es si la expresión diferencial es debida a un problema de metilación de los promotores Tg y SP-B en los dos tejidos (pulmón y tiroides). Finalmente otra de las hipótesis que barajamos es la existencia de proteínas nucleares (co-activadoras o co-represoras) que interaccionen con TTF-1 y que se expresen de forma diferencial en ambos tejidos.

Factores de transcripción y vías de transducción de señales implicados en la regulación del gen del enzima málico citosólico.

(I. Barroso, M.T. Seisdedos y P. Santisteban)

La expresión del gen del enzima málico citosólico (ME) está regulada hormonalmente. En este trabajo nos hemos centrado en un estudio en profundidad del control transcripcional de ME por insulina en células de hepatoma de rata H35. Mediante ensayos de transfección transitoria hemos localizado el elemento de respuesta a insulina el promotor de ME. Por ensayos de retardo en gel hemos demostrado que Sp1 y Sp3 se unen a ese elemento de manera constitutiva. El tratamiento con insulina induce la unión rápida y transitoria del factor de respuesta temprano Egr-1, el cual desplaza a Sp1 de su sitio de unión al DNA. La inducción de Egr-1 depende de la estimulación de la ruta Ras/MAPK e inhibe el promotor de ME, lo que podría formar parte de una respuesta mitogénica de las células a la insulina. En una fase más tardía la hormona induce la transcripción del gen, mediante la activación de una ruta distinta que depende de PI3-K. En ésta respuesta tardía podría participar Sp1. La funcionalidad de Sp1 la hemos estudiado en ensayo de transfección transitoria usando como modelo células de *Drosophila* SL-2 (que no expresan éste factor). Actualmente estamos estudiando en detalle la cooperación de Sp1 con miembros de la

superfamilia de receptores nucleares que también regulan el promotor de ME.

Finalmente hemos estudiado el control de la expresión de ME por hexaclorobenceno (HCB), un compuesto que actúa a través del receptor de dioxinas. Hemos demostrado que la transcripción de ME está bajo el control de HCB, habiendo delimitado en el promotor ME un elemento de respuesta a xenobióticos (XRE). Lo más interesante es que el elemento XRE coincide con un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) previamente definido en dicho promotor. El HCB induce una proteína nuclear que se une al elemento XRE/TRE, cuyas propiedades de unión al DNA son similares a las de los receptores nucleares pero cuya identidad nos es aún desconocida.

Publicaciones

Cruz, F., Scott, S. R. , Barroso, I., Santisteban, P. and Cerdan, S. (1998) Ontogeny and cellular location of the pyruvate recycling system of rat brain. *J. of Neurochemistry* 70, 2613-2619

Velasco, J.A., Acebrón, A, Zannini, ME., Martín-Pérez, J., Di Lauro, R. and Santisteban, P. (1988) *Ha-ras* interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of TTF-1 phosphorylation. *Endocrinology*, 139, 2796-2802

Moreno, J.C. and Santisteban, P. (1998) Contribución de la investigación básica a la práctica de la endocrinología. *Endocrinología* 45, 41-43

Santisteban, P. (1999) Biología molecular del tiroides. En: Actualizaciones en Endocrinología: Tiroides (Dieguez, C., Pavia, C., Yturriaga R., eds). McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, pp 73-93

Moreno, J.C. (1999) Bocios disenzimáticos. En: Actualizaciones en Endocrinología: Tiroides (Dieguez, C., Pavia, C., Yturriaga R., eds). McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, pp 209-233.

Medina, D.L., Velasco, J.A. and Santisteban, P. (1999) Somatostatin is Expressed in FRTL-5 cells and prevents TSH-mediated down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. *Endocrinology* 140, 87-95

Ros, P., Rossi, D., Acebrón A. and Santisteban, P. (1999) Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie* 81, 389-396

Losada, A., Xia, H., Migliazza, L., Diez-Pardo, J.A., Santisteban, P., and Tovar, J.A. (1999) Lung hypoplasia caused by nitrofen is mediated by down-regulation of the transcription factor TTF-1. *Pediatric Surg. Int.* 15, 188-191

Ortiz, L., Aza-Blanc, P., Zannini, M., Cato A.B. and Santisteban, P. (1999) The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF1 is required for an efficient hormonal regulation of thyroperoxidase gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 15213-15221

Barroso I., and Santisteban, P. (1999) Insulin-induced early growth response gene (*Erg-1*) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 17997-18004

Barroso, I., Benito, B., García-Jiménez, C., Hernández, A., Obregón. M-J. and Santisteban, P. (1999) Norepinephrine, triiodothyronine and insulin up-regulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene during brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinology* 141, 169-179

Loaiza-Pérez, A., Kleiman de Pisarev, D., Seisedos, M. T., Randi, A., Ferramola, A.M., Sancovich, H and Santisteban, P. (1999) Hexachlorobencene, a dioxin-type compound, increase malic enzyme gene transcription through a mechanism involving the thyroid hormone response element. *Endocrinology* 140, 4142-4151

Tesis doctorales

Lourdes Ortiz

“Interacción del factor fork head TTF-2 con factores constitutivos CTF/NF-1 en el control hormonal de la transcripción del gen de peroxidasa tiroidea”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencia Químicas. 1998. Directora: Pilar Santisteban. Calificación: Sobresaliente "*cum laude*"

Andrea Loaiza

“Estudios del mecanismo molecular de acción del hexaclorobenceno sobre la expresión del gen de la enzima málica citosólica hepática”. Universidad de Buenos Aires (Argentina). Facultad de Ciencia Exactas y Naturales. 1998. Directora: Pilar Santisteban. Co-directores: Horacio A. Sancovich y Diana L. Kleiman. Calificación: Sobresaliente

Isabel Barroso

“Caracterización de los elementos en *cis* y en *trans* que median la regulación por insulina del gen del enzima málico citosólico”. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 1999. Directora: Pilar Santisteban. Calificación: Sobresaliente "*cum laude*"

Mecanismos moleculares de diferenciación neural

- Investigador Principal: Vallejo, Mario, Científico Titular
- Becarios Postdoctorales: Glinski, Mirko
Pérez-Villamil, Beatriz (hasta Mayo 1999)
Schwartz, Petra (hasta Septiembre 1998)
Chen, Li-Chun (hasta Octubre 1998)
Vallejo, Inmaculada (hasta Julio 1999)
- Becarios Predoctorales: Cebolla, Beatriz
Mirasierra, Mercedes
Sáinz, Aránzazu
- Colaboraciones: García-Olmo, Damián (Hospital General de Albacete)

Palabras Clave

Diferenciación neural; regulación génica; homeodominios; somatostatina; cAMP; astrocitos.

Participación de sistemas de señalización dependientes de cAMP en la diferenciación de astrocitos

(I. Vallejo, L-C Chen, B. Cebolla, M. Vallejo)

Los experimentos de diferenciación neural se realizaron inicialmente con células precursoras neurales RC2.E10, y posteriormente con cultivos primarios de células corticales embrionarias. Las células RC2.E10 constituyen una línea monoclonal establecida en nuestro laboratorio a partir de cultivos primarios de córtex cerebral de embrión de rata preparados el día 16 de gestación (E16). Su inmortalización condicional se realizó mediante la transducción retroviral de un mutante termosensible de antígeno T del virus simio 40 (SV40T). Rutinariamente proliferan a una temperatura de incubación de 33°C en presencia de suero fetal bovino (10%). El oncogén inmortalizador puede inactivarse mediante el aumento de la temperatura de cultivo a 39°C, temperatura a la que las células RC2.E10 exhiben características fenotípicas propias de células progenitoras neurales (proliferación dependiente de bFGF en medio sin suero; expresión del marcador específico nestin; y supervivencia a largo plazo comprometida, incluso en presencia de suero).

En presencia de bFGF, el tratamiento de las células RC2.E10 con 8-Br-cAMP, un análogo estable y liposoluble del cAMP, induce importantes cambios en la morfología de las células, que adquieren un aspecto estrellado en pocas horas. Para comprobar si la respuesta diferenciadora observada tras la estimulación por AMPc representa un cambio de identidad celular, llevamos a cabo estudios inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos monoclonales correspondientes a marcadores específicos de neuronas (MAP-2, NCAM y calbindina), oligodendrocitos (galactocerebrósido) y astrocitos (GFAP y S100b). Estas tinciones inmunocitoquímicas demostraron que, antes de la estimulación por AMPc, las células no expresan ninguno de los marcadores neuronales o gliales. Sin embargo, una vez diferenciadas con 8Br-AMPc o forskolina, las células RC2.E10 adquieren inmunorreactividad positiva para GFAP y S100b, pero no para MAP-2, NCAM, calbindina o galactocerebrósido, y disminuyen considerablemente su inmunorreactividad para nestin. Estos resultados indican que la estimulación por AMPc induce la diferenciación de las células progenitoras RC2.E10 en astrocitos. Mediante la cuantificación del porcentaje de células que incorporan bromodeoxiuridina (BrdU), comprobamos que esta respuesta diferenciadora se acompaña de una disminución de la proliferación celular.

Experimentos similares han sido llevados a cabo utilizando cultivos primarios de células progenitoras obtenidas de la corteza cerebral de ratas en desarrollo embrionario, extraídas a los 17 días de gestación (E17). Utilizando los cultivos primarios se pretende determinar la identidad de los factores neurotróficos corticales que estimulan la síntesis intracelular de AMPc en células

precursoras, y su interacción con otros agentes inductores de la diferenciación de astrocitos.

Identificación y caracterización de factores de transcripción tipo homeodominio en células nerviosas

(B. Pérez-Villamil, P. Schwartz, A. Sáinz, M. Vallejo)

En el control de la diferenciación regional y celular del sistema nervioso central intervienen genes que codifican factores de transcripción tipo homeodominio. Entre estos, cabe destacar los correspondientes a las familias *Orthodenticle* y *Distal-less*, ya que parecen estar implicados en procesos de especificación del fenotipo de algunos tipos neuronales.

Utilizando RT-PCR con oligonucleótidos degenerados correspondientes a regiones homólogas de los homeodominios de estas familias, en combinación con técnicas RACE ("Rapid Amplification of cDNA Ends"), hemos identificado y clonado, a partir de RNA preparado de células precursoras hipocámpicas y corticales, cDNAs que codifican dos nuevas proteínas tipo homeodominio, denominadas Opx-1 (Ordhodenticle and Pax-related homeobox) y Drx-1 (Distal-less-related homeobox). Utilizando RT-PCR para detectar la presencia de RNA, así como hibridación in situ, encontramos que Opx-1 se expresa abundantemente en el mesodermo de embriones relativamente jóvenes (E11.5), mientras que en embriones en estadios más avanzados (E14 a E19) se observa su expresión en el sistema nervioso central, restringida fundamentalmente a los segmentos anteriores del cerebro. Por el contrario, los niveles de expresión de Drx-1 son más bajos en estadios tempranos del desarrollo embrionario, y aumentan considerablemente en el sistema nervioso central alrededor de E15, con igual distribución en regiones prosencefálicas y mesencefálicas.

En estudios llevados a cabo en líneas celulares de precursores corticales in vitro demostramos que la expresión de Drx-1 puede ser inducida selectivamente por CNTF pero no por otras neurotrofinas, y por lo tanto puede intervenir en los procesos de diferenciación desencadenados por este factor.

Ya que tanto Opx-1 como Drx-1 se expresan en pre-astrocitos RC2.E10 descritos en la sección anterior, hemos investigado la hipótesis según la cual estos factores de transcripción pueden participar en la expresión del gen de GFAP. Un examen de la secuencia del promotor de este gen reveló la presencia de tres regiones con capacidad de proporcionar sitios de unión específica de proteínas tipo homeodominio, habida cuenta que contienen el consenso TAAT. A estos elementos los hemos denominado GFAPT1, GFAPT2 y GFAPT3. Hemos comprobado que Opx-1 presente en extractos nucleares de células RC2.E10 se une específicamente a GFAPT2 y GFAPT3, pero no a GFAPT1. Sin embargo, Opx-1 recombinante, expresado in vitro, sólo es capaz de reconocer GFAPT3, y por lo tanto es posible que necesite una interacción con otros factores para reconocer GFAPT2. Utilizando anticuerpos específicos generados en nuestro laboratorio hemos comprobado que este es el caso, y que uno de estos factores es Drx-1. Nuestros estudios, utilizando también homeodominios de otro tipo, indican que tanto Opx-1 como Drx-1 son capaces de interactuar entre sí y con otras proteínas, y alterar la especificidad de su unión a secuencias de DNA dependiendo de qué proteínas están asociadas a estos factores de transcripción. Por último, hemos comprobado que los perfiles de unión de estos homeodominios al DNA guarda una correlación estricta con su capacidad de transactivación, evaluada en experimentos de transfección en varios tipos de células.

Regulación de la expresión génica específica en el sistema nervioso central

(P. Schwartz, M. Mirasierra, M. Vallejo)

Los mecanismos moleculares que generan diversidad celular en los segmentos anteriores del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario se desconocen en gran medida. Numerosos datos experimentales sugieren que factores de transcripción tipo homeodominio juegan un papel importante durante la diferenciación de las células precursoras neurales mediante la regulación de la expresión de genes diana que codifican proteínas que confieren características fenotípicas específicas. Para estudiar este aspecto centramos nuestra atención en el

estudio de la regulación del gen que codifica el neuropéptido somatostatina, cuya expresión confiere específicamente identidad fenotípica a diversas neuronas del sistema nervioso central y a algunas células gliales.

Con el fin de identificar elementos reguladores que participan en el control neural de la expresión génica de somatostatina, realizamos transfecciones en células RC2.E10, utilizando plásmidos en los que la transcripción del gen que codifica la enzima bacteriana cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) se coloca bajo la influencia del promotor del gen de somatostatina. Mediante la introducción de deleciones y mutaciones en el promotor de somatostatina, comprobamos que la regulación neural de este gen está mediada por elementos reguladores tanto estimuladores como represores que parecen actuar coordinadamente. El elemento regulador que media las repuestas transcripcionales dependientes de AMPc ("cAMP response element, CRE) parece jugar un papel primordial como potente activador de la transcripción incluso en condiciones basales, y su integridad es absolutamente necesaria para la expresión del gen. Por otro lado, elementos reguladores que en células pancreáticas se comportan como activadores de la transcripción mediante la unión de factores tipo homeodominio (elementos TAAT), exhiben actividad represora en células neurales en condiciones basales. El análisis de la movilidad electroforética de oligonucleótidos TAAT marcados e incubados en presencia de extractos de proteínas nucleares neurales indica que algunos de los complejos DNA-proteína contienen los factores homeodominio Opx-1 e IDX-1.

Expresión del factor homeodominio IDX-1 en el sistema nervioso central

P. Schwartz, M. Glinski, M. Vallejo)

En un estudio preliminar diseñado para detectar la posible presencia de homeodominios tipo Hox en el sistema nervioso central, utilizando oligonucleótidos de secuencia degenerada correspondientes a las regiones más conservadas del homeodominio, encontramos que el 34% de los clones aislados a partir de ARNm de córtex cerebral corresponden al factor de transcripción IDX-1.

IDX-1 es un factor tipo homeodominio previamente identificado en células pancreáticas y duodenales, que participa en la regulación de la expresión de los genes que codifican insulina y somatostatina y en el desarrollo pancreático.

Mediante RT-PCR semicuantitativo, utilizando oligonucleótidos específicos para IDX-1, comprobamos que este factor se expresa en el sistema nervioso central en desarrollo, con niveles máximos en embriones de 15 días de gestación, momento a partir del cual su expresión disminuye considerablemente. En el cerebro adulto se detectó su presencia en el diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo y córtex cerebral. Estos hallazgos se corroboraron inmunohistoquímicamente utilizando un anticuerpo (a253) que reconoce específicamente los 12 aminoácidos del extremo carboxílico de IDX-1, lo cual demostró su presencia, entre otras regiones, en el córtex cerebral, eminencia gangliónica, área talámica e hipotálamo, y colículos inferiores de embriones de rata de 15 días de gestación.

Mediante inmunodetección por Western con el anticuerpo a253, confirmamos la presencia de IDX-1 en extractos de cerebro embrionario (E15 y E17), en un estudio comparativo en el que se incluyeron como controles positivos tanto IDX-1 recombinante como extractos de células pancreáticas. Asimismo, detectamos mediante estos estudios la presencia de IDX-1 en células neuroprecursoras RC2.E10.

La presencia de IDX-1 en células RC2.E10 nos permitió iniciar estudios encaminados a evaluar si IDX-1 contribuye a la regulación de la expresión del gen de somatostatina en células neurales. Mediante transfecciones utilizando un vector de expresión de IDX-1, determinamos que IDX-1 estimula la transcripción del gen de somatostatina en células RC2.E10, acción para la cual se requiere la integridad del elemento SMS-EU, y también de otro elemento TAAT identificado en estos estudios, que denominamos SMS-TAAT3. Mediante análisis de movilidad electroforética en presencia de anticuerpo a253, se observó que extractos de proteínas nucleares tanto de células neuroprecursoras RC2.E10 como de cerebro embrionario de rata, contienen IDX-1 que reconoce específicamente SMS-UE y SMS-TAAT3.

Publicaciones

- Schwartz, P. y Vallejo, M., (1998) Differential regulation of basal and cyclic AMP-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. *Mol Endocrinol* 12, 1280-1293.
- Vallejo M y Lightman SL. (1998) *Molecular Biology of Endocrine Systems: Basic Principles*. En: *Clinical Endocrinology*. (A. Grossman, ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- McManus, M., Chen, L-C., Vallejo, I. y Vallejo, M. (1999) Astroglial differentiation of cortical precursor cells triggered by activation of the cAMP-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 19, 9004-9015.
- Perez-Villamil, B., Schwartz, P.T. y Vallejo, M. (1999) The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140, 3857-3860.
- Garcia-Olmo, D., Ontañón, J., Garcia-Olmo, D.C., Atienzar, M. y Vallejo, M. (1999) Detection of genomically-tagged cancer cells in different tissues at different stages of tumor development: lack of correlation with the formation of metastasis. *Cancer Letters* 140, 11-20
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D.C., Ontañón, J., Martinez, E. y Vallejo, M (1999) Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of genometastasis. *Histol Histopathol* 14, 1159-1164.

Departamento de Enzimología y Patología Molecular

Bases estructurales del control, expresión e interacción con la formación de microtúbulos de fosfofructokinasas eucarióticas. Evaluación in vivo de lactasa intestinal mediante galactosil-xilosas.

Investigador Principal:	Aragón, Juan J., Catedrático UAM
Personal de Apoyo:	Sánchez, Valentina
Becarios Postdoctorales:	Martínez-Costa, Oscar
Becarios Predoctorales:	Santamaría, M ^a Belén Hermida, Carmen Sanchez, Cristina (hasta Enero 1999)
Colaboraciones:	Avila, Jesús, Centro de Biología Molecular CSIC-UAM Escalante, Ricardo, IIB-AS Fernández- Mayoralas, A. , Instituto de Química Orgánica CSIC, Madrid Heinisch, Jürgen J. , Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Alemania.

Palabras clave

Fosfofructokinasa, lactasa intestinal, tubulina, relación estructura/función, *Dictyostelium discoideum* , células tumorales

Análisis estructural del control y expresión de la fosfofructokinasa de células eucarióticas.

(M.B. Santamaría, C. Sánchez, O. Martínez-Costa, V. Sánchez y J.J. Aragón)

Esta línea se dirige al análisis de los motivos estructurales implicados en la catálisis y la regulación de la fosfofructokinasa (PFK), enzima clave para el metabolismo de carbohidratos, y al estudio del control de la expresión del isozima C en células tumorales. La construcción de dos PFKs quiméricas mediante el intercambio de las mitades N- y C-terminales de los isozimas M de músculo y C de tumor ascítico, que tienen características reguladoras diferentes, nos ha permitido evaluar la contribución de cada uno de estos dominios al centro activo y a los sitios de ligamiento de varios efectores alostéricos. A través de delecciones y mutaciones seriadas, hemos caracterizado en detalle una región del enzima no regulador de *Dictyostelium discoideum* responsable de su falta de control alostérico. El comportamiento de mutantes en dicha región, las diferencias estructura/función entre los isozimas C y M y la conducta de las PFKs quiméricas han señalado el interés potencial de determinados residuos cuya implicación en la unión de ligantes específicos estamos examinando por análisis mutacional. La obtención en el laboratorio de cada uno de estos isozimas como proteínas recombinantes en cantidades importantes hace además accesible su cristalización, de interés capital para esta línea al no haberse resuelto aún la estructura tridimensional de ninguna PFK eucariótica. Por otra parte, a la vista del elevado contenido en isozima C de las células tumorales, en las que su expresión está sometida a control a largo plazo durante el desarrollo del tumor, estamos tratando de aislar y caracterizar la región promotora de este gen y pretendemos estudiar la relación de su expresión con el proceso de diferenciación celular.

Interacción de la fosfofructokinasa de *D. discoideum* con la formación de microtúbulos.

(M.B. Santamaría, O. Martínez-Costa, V. Sánchez y J.J. Aragón)

Tras haber identificado este enzima como un potente inhibidor específico de la polimerización de tubulina, hemos evidenciado la formación de complejos tubulina-PFK y estamos tratando ahora de examinar, por un lado, el posible papel in vivo de este efecto (enteramente diferente de la función catalítica de este enzima) mediante anulación y sobreexpresión del gen *pfk* en *D. discoideum* (en colaboración con el Dr. R. Escalante) y transfección y/o microinyección de la proteína en células animales (en colaboración con el grupo del Dr. J. Avila del Centro de Biología Molecular) y, por otro, de caracterizar a nivel molecular la interacción del inhibidor con tubulina.

Empleo de galactosil-xilosas para la evaluación in vivo de lactasa intestinal como posible método diagnóstico de la deficiencia de este enzima.

(C. Hermida y J.J. Aragón)

La administración oral de 4-galactosil-xilosa a ratas lactantes conduce a la eliminación en orina de la xilosa resultante de su hidrólisis por la lactasa intestinal, donde puede ser determinada mediante un simple ensayo colorimétrico. La fuerte correlación existente entre la xilosa excretada y los niveles de lactasa intestinal a lo largo del desarrollo de los animales, junto con el relativamente simple proceso de síntesis del disacárido (desarrollado por el grupo del Dr. A. Fernández-Mayoralas), lo reducido de la dosis necesaria del mismo y la sencillez de la valoración de xilosa (compuesto por otra parte fisiológico), nos ha llevado a proponer esta sistemática como método de diagnóstico no invasivo de la deficiencia de lactasa y en general de la integridad funcional de la mucosa intestinal, con interés particular en pediatría. Hemos examinado la eficacia de 4-galactosil-xilosa frente a los regioisómeros 3- y 2-galactosil-xilosa (productos colaterales de la síntesis), resultando ser el primero el más idóneo para la evaluación in vivo de la actividad del enzima a pesar de que la lactasa muestra una eficacia catalítica in vitro muy superior para los otros dos compuestos. Actualmente estamos optimizando la evaluación in vivo del enzima a través de los niveles en sangre de xilosa, procedimiento alternativo mínimamente cruento que puede ser de gran valor práctico en sujetos lactantes. En colaboración con la industria farmacéutica se está llevando a cabo la síntesis a mayor escala del disacárido con vistas al inicio de ensayos clínicos en fase I.

Publicaciones

Orosz, F., Santamaría, B., Ovádi, J., and Aragón, J.J. (1999) Phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum* is a potent inhibitor of tubulin polymerization. *Biochemistry* 38, 1857-1865.

Tesis Doctorales

Cristina Sánchez Martínez

"La fosfofructokinasa C de tumor ascítico de Ehrlich: estructura, expresión y manipulación genética". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director: Juan J. Aragón. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Caracterización estructural y funcional de nuevos genes humanos

Investigador Principal:	Coloma Jerez, Anotnio, Profesor Titular
Investigadores Asociados: Fac. Medicina UAM	Caballero Borda, Amelia, Prof. Titular Ciencias Morfológicas.
Personal de Apoyo	Candel Alvarez, Elena (Ayudante de Investigación)
Becarios Predoctorales:	Martínez de Arrieta Martínez, Cruz (1994-98)
Colaboraciones	Cruces, Jesús (IIB) Bernal, Juan (IIB)

Palabras Clave

Clonación, secuenciación, cartografiado cromosómico, patología molecular

Caracterización del gen humano *POMT1*, que codifica una O-manosiltransferasa

(A. Coloma, A. Caballero y Jesús Cruces)

Hemos clonado y caracterizado un gen humano (*POMT1*) que es homólogo de *rotated abdomen*, una mutación recesiva de *Drosophila* que produce rotación del abdomen de las moscas afectadas. *POMT1* se localiza en 9q43.1, es de expresión ubicua, y codifica una proteína con una secuencia homóloga a las O-manosiltransferasas de levadura (Pmts). Se trata del primer hallazgo de una proteína de este tipo en mamíferos, y hemos detectado también la existencia de este gen en ratón. En base al fenotipo observado en *Drosophila*, estamos investigando si un déficit en la expresión de *POMT1* puede determinar la aparición de algún tipo de trastorno genético relacionado con el desarrollo del sistema muscular.

Regulación de la expresión del gen humano de neurogranina (*NRGN*)

(A. Coloma, C. Martínez de Arrieta, E. Candel y J. Bernal)

Hemos identificado y descrito la estructura del gen *NRGN* que está localizado en el cromosoma 11q24. Este gen codifica neurogranina, una proteína de expresión exclusivamente neuronal, cuya expresión en la rata está regulada por la hormona tiroidea. Asimismo, *NRGN* contiene un elemento de respuesta a esta hormona, que está localizado dentro del primer intrón, unas 3 Kb después del sitio de inicio de la transcripción. Nuestros datos sugieren que este gen es una diana directa de la hormona tiroidea en cerebro.

Publicaciones

Pérez Jurado, L., Wang, Y., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J. y Francke, U. (1998) A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-35, a phosphorylation target of BTK. *Human Mol. Genet.* 7: 325-334

Coloma, A. Aplicaciones médicas de la Biotecnología: El desarrollo de la Genética Molecular Humana, en *Genes en el laboratorio y en la fábrica*. Alicia Durán y Jorge Riechmann (Eds.). Editorial Trotta, Madrid 1998, pp 71-80

Martínez de Arrieta, C., Morte, B., Coloma, A. y Bernal, J. (1999) The human RC3 gene

homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology* 140: 335-343

Pérez Jurado, L., Coloma, A. y Cruces, J. (1999) Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (*POMT1*) encoding a putative protein O-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics*, 58: 171-180.

Tesis doctorales

Cruz Martínez de Arrieta Martínez

"Identificación y caracterización del gen humano NRG1. Estudio de su regulación por hormona tiroidea" Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1998. Director: Antonio Coloma Jerez. Calificación: Apto cum laude.

Control de la expresión y modulación de actividades enzimáticas en levadura y sistemas en desarrollo.

Investigador Principal: Fernández de Heredia, Claudio, Profesor de Investigación. Dr. vinculado "ad Honorem".

Personal de Apoyo Navarro Palanca, M^a Asunción

Palabras Clave:

Carbohidratos; *Saccharomyces*; Nucleótidos cíclicos; Fosfodiesterasas

Interacciones en el metabolismo de mono- y disacáridos en *Saccharomyces cerevisiae*.

(C.F.Heredia y A. Navarro).

Continuando el trabajo sobre interacciones en el metabolismo de mono- y disacáridos en levadura, hemos centrado la atención en el estudio de las características de la secreción de glucosa a partir de maltosa provocada por la presencia de hexosas (manosa o galactosa) en los medios, llegando a las siguientes conclusiones: a) la cantidad de glucosa secretada representa cuando menos la mitad de la maltosa transportada por la célula b) la secreción de glucosa se yugula por agentes (dinitrofenol, acetato de uranilo) que impiden la entrada de maltosa a la célula indicando que no es consecuencia de hidrólisis extracelular del disacárido; c) implica la acción de agentes muy lábiles (además de y distintos del transportador de maltosa) que se inactivan por presencia de mezclas de maltosa y una hexosa fermentable (glucosa, fructosa, manosa o galactosa); d) estos agentes reaparecen de nuevo por incubación de la levadura en medios con maltosa y su reaparición es bloqueada por cicloheximida o por presencia de hexosas fermentables.

Metabolismo de nucleótidos monofosfato cíclicos.

(C.F.Heredia y A. Navarro)

Hemos finalizado el estudio de caracterización de una fosfodiestearasa de *Fusarium culmorum* que hidroliza nucleósidos 2',3' monofosfato cíclicos dando como productos los correspondientes nucleósidos 3'-fosfato. En contraste con un enzima similar encontrado en bacterias, el enzima de *Fusarium* no tiene actividad nucleotidasa, no tiene requerimientos metálicos, es inhibido por concentraciones micromolares de Cu^{++} y Zn^{++} y es muy resistente a calor. El enzima hidroliza los cuatro nucleósidos 2',3' monofosfato, es inactivo sobre nucleósidos 3',5' monofosfato, tiene mayor afinidad por los de bases púricas (K_{ms} : Ado-2',3'-P=0.3 mM y Guo-2',3'-P=0.1 mM) que pirimídicas (K_{ms} : Cyd-2',3'-P=0.6 mM y Urd-2',3'-P=2 mM) y carece de actividad ribonucleasa (*En prensa*).

Hemos desarrollado un método enzimático que permite la determinación cuantitativa de concentraciones micromolares de citidín 2'-fosfato aún en presencia de concentraciones al menos cinco veces mayores de una gran variedad de otros nucleótidos. El método permite también la detección de la actividad 2',3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa (EC 3.1.4.37) y su discriminación de la 2',3'-nucleotido cíclico 2'-fosfodiesterasa (EC 3.1.4.16).

Publicaciones.

Heredia, C.F. (1998) Impairment by hexoses of the utilization of maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1425, 151-158

Díaz, A.R. and Heredia, C.F. (1999) Use of ribonuclease VI from *Artemia* for the determination of cytidine 2'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 404-407.

Mecanismos de resistencia celular a antifolatos: evaluación de inhibidores de enzimas dependientes de folatos como posibles agentes antitumorales.

Investigador Principal: Llorente, Pilar. Investigador Científico
Investigadores Asociados: Rivera, Pilar. I.I.B de Barcelona.
Grau, Rosa. I.I.B de Barcelona.
Personal de Apoyo: Argomaniz, Luisa.
Colaboraciones: Aran, Vicente. Inst. de Química Médica .C.S.I.C

Palabras Clave

Antifolatos, resistencia celular, LLA murina (L5178 Y), líneas celulares humanas (PANC-1, HT-29 y MCF-7). FPGS, Inhibidores,

Evaluación de inhibidores de enzimas dependientes de folatos como posibles agentes antitumorales.

(P.Llorente, P.Rivera, R.Grau and L.Argomaniz)

La resistencia inducida o adquirida de ciertas neoplasias a la terapia citotóxica es su principal problema clínico. Existen numerosos mecanismos de resistencia a drogas, dilucidados principalmente por estudios *in vitro*, que incluyen mutaciones en los genes "diana", amplificación de genes, diferencias en la capacidad de regeneración, cambios en la capacidad de transporte y/o captación de las drogas, diferencias en las rutas de recuperación de nucleósidos y bases y, en el caso de los antifolatos, la poliglutamilación.

El requerimiento esencial por los folilpoliglutamatos para la viabilidad celular y la importancia de la poliglutamación de los antifolatos para ejercer su toxicidad sugiere que alteraciones en la síntesis de poliglutamatos, por la acción de la folilpoliglutamato sintetasa (FPGS) pueden tener importantes efectos terapéuticos. Estas alteraciones pueden ser inducidas indirectamente, por cambios en la distribución de un átomo de carbono en el acervo de folatos, o directamente a través de efectos sobre la FPGS. En esta última hipótesis se han basado nuestros estudios, para lo que se diseñaron y sintetizaron compuestos, derivados de pterina, posibles productos de hidrólisis celular de folatos naturales y antifolatos (MTX) que hemos demostrado son potentes inhibidores, principalmente pterina, 6-carboxipterina y sus correspondientes 4-amino derivados, de la actividad FPGS en células de LLA murina, L5178 y sublíneas con distintos fenotipos de resistencia a antifolatos.: R/15MTX, R/600MTX, MTX y R/10500MTX.

Dada la similitud y/o interacción de los efectores de algunas enzimas dependientes de folatos con otras enzimas implicadas en el metabolismo de folatos a nivel intracelular y que se ha descrito son afectados por poliglutamatos como TS, GARFT y AYCART, claves en la vía de síntesis de purinas, estamos realizando el estudio de la evaluación de los compuestos inhibidores de FPGS mencionados sobre estas enzimas en las líneas celulares de LLA murina descritas y en las celulares humanas: carcinomas de páncreas (PANC-1 y BxPC-3), colon (HT29) y mama (MCF-7) y de cultivos de células normales para descartar un efecto tóxico inespecífico.

Síntesis y evaluación enzimática de nuevos derivados de pterina

(V.Arán, L.Argomaniz y P.Llorente)

El estudio de la estructura-función de los inhibidores de FPGS descritos ha llevado al diseño y posible síntesis de otros compuestos, análogos y más lipofílicos que ejerzan una acción inhibidora más potente, con disminución de las $K_i(s)$ sobre las enzimas objeto de estudio y de la toxicidad e incremento del transporte celular.

Publicaciones

Rubio,V., Llorente, P. and Britton,H.G. (1998). Mechanism of carbamoyl phosphate synthetase from E.coli. Binding of the molecules used in the reaction and sequestration by the enzyme of the ATP molecule that yields carbamoyl phosphate. *Eur.J.Biochem.* 255, 262-270.

Metabolismo y función de dinucleósido polifosfatos

Investigadores Principales:	Sillero, Antonio Günther, María Antonia
Personal de Apoyo	Diego, Ana Isabel de García, Teresa (marzo - noviembre 1998) Akli, Hocine (junio 1998) Barnault, Elodie (junio-julio 1999)
Becarios Predoctorales:	Madrid, Olga (hasta enero 1999) Atencia, Eva Ana
Estudiante Erasmus	Osorio, Hugo A. Carvalho Pinheiro (abril-Julio 1999) procedente de la Universidad de Oporto, Portugal

Palabras Clave

Dinucleósido polifosfatos; luciferasa, T4 DNA ligasa, T4 RNA ligasa; modelos matemáticos del metabolismo

Aspectos teóricos del metabolismo.

Torrecilla, A.F. Marques, E.A. Atencia, M.A.Günther y A.Sillero)

A raíz de la purificación, a partir de sobrenadantes de cerebro de rata, de una 5'-nucleotidasa citosólica (e-Ns) se ha intentado medir su influencia sobre el metabolismo de nucleósido monofosfatos, principalmente AMP en ese tejido. Para ello se ha seguido un doble tipo de estudio: experimental y teórico. En el primero, los nucleótidos se incubaban con citosol de cerebro de rata y se seguía su destino metabólico a lo largo del tiempo, en ausencia y presencia de efectores, mediante técnicas de HPLC. Así pudo seguirse la desaparición de nucleótidos, la aparición de los distintos productos, y en muchos casos las constantes cinéticas de los enzimas que participaban en estas rutas metabólicas. El estudio teórico consistió en el desarrollo de una serie de ecuaciones diferenciales que describían la concentración de cada uno de los metabolitos de esas rutas. Los valores de las constantes para estas ecuaciones se determinaron experimentalmente. El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió con el Programa Mathematica. En general se obtuvo un buen acuerdo entre los métodos experimental y teórico. Este último método permite el planteamiento de situaciones metabólicas que no pueden ser resueltas experimentalmente.

Mecanismo de la formación de luz y de la síntesis de dinucleósido polifosfatos por la luciferasa de luciérnaga (EC 1.12.13.7).

(R.Fontes, A.de Diego, M.A.Günther y A.Sillero)

La luciferasa de luciérnaga es ampliamente utilizada en la valoración de ATP y como enzima testigo en Ingeniería genética. Su modo de acción no es todavía bien conocido. Actualmente se continúa investigando su mecanismo de acción a través de la búsqueda de posibles inhibidores específicos de algunas de las funciones catalíticas de este enzima: producción de luz y síntesis de dinucleósido polifosfatos. Asimismo se estudia su posible papel en la síntesis *in vivo* de dinucleósido polifosfatos en células capaces de expresar el gen de la luciferasa.

Síntesis de dinucleósido polifosfatos por la DNA ligasa y por la RNA ligasa del bacteriófago T4.

(E.A. Atencia, O. Madrid, M. A. Günther y A. Sillero)

Habíamos visto la capacidad de la luciferasa y las acetil y la acil-CoA sintetasas de sintetizar dinucleósido polifosfatos. En todos estos casos la síntesis tiene lugar mediante transferencia de AMP de un complejo E-X-AMP a un NTP (donde X representa un residuo ácido): Más recientemente hemos visto que la transferencia de AMP a un NTP, o a un polifosfato, puede tener lugar desde un complejo E-AMP, tal como ocurre con ambas ligasas del bacteriófago T4.

La DNA ligasa de T4 (EC 6.5.1.2) cataliza la transferencia de AMP desde el complejo E-AMP a tripolifosfato (P₃), ADP, ATP, GTP o dATP, produciendo p4A, Ap3A, Ap4A, Ap4G y Ap4dA, respectivamente. El DNA mellado compete muy eficazmente con el GTP para la síntesis de Ap4N y, a la inversa, P₃ o GTP inhiben la ligadura de DNA por la ligasa. Puesto que la ligasa de T4 es similar en sus requerimientos de ATP a la ligasa de mamíferos, es de esperar que este último enzima sea también capaz de sintetizar dinucleósido polifosfatos. Todo ello podría estar relacionado con la proteína humana Fhit (de fragile histidine triad) una típica dinucleosido trifosfatasa, codificada por gen FHIT, posible gen supresor de tumores. La RNA ligasa del bacteriófago T4 (EC 6.5.1.3). se comporta de un modo similar a la DNA ligasa. Con este enzima hemos observado, adicionalmente, que algunos 3',5'-nucleósidos bisfosfatos son potentes inhibidores de la síntesis de Ap4N.

Publicaciones

Fontes, R., Günther Sillero, M. A. & Sillero, A. (1998) Acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates, J. Bacteriol., 180, 3152-3158.

Marques, A. F. P., Teixeira, N. A., Gambaretto, C., Sillero, A. & Günther Sillero, M. A. (1998). IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain. Activation by polyphosphates. J. Neurochem. 180, 3152-3158.

Madrid, O., Martín, D., Atencia, E. A., Sillero, A. & Günther Sillero, M. A. (1998) T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates. FEBS Lett., 1998, 433, 283-286.

Fontes, R., Ortiz, B., de Diego, A., Sillero, A. & Günther Sillero, M. A. (1998) Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap4A catalyzed by firefly luciferase. FEBS Lett., 1998, 438, 190-194.

Fontes, R., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1999) Acyl-CoA synthetase catalyzes the synthesis of diadenosine hexaphosphate (Ap6A) and diadenosine pentaphosphate (Ap5A). Biochimie, 81, 229-233.

Atencia, E. A., Madrid, O., Günther Sillero, M.A. & Sillero, A. (1999) T4 RNA ligase catalyzes the synthesis of dinucleoside polyphosphates. Eur. J. Biochem. 261, 802-811

Tesis doctorales

Madrid Pérez, Olga "Síntesis de di-2',3'-dideoxinucleósidos polifosfatos catalizada por luciferasa de luciérnaga y T4DNA ligasa. Exploración del metabolismo de los (2',3'-dideoxi)nucleótidos". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica. 1999. Directores: María Antonia Günther y Antonio Sillero. Calificación: Sobresaliente "cum laude"

Departamento de Estructura y Función de Biomoléculas

Activación y función de COT/TPL-2 quinasa en la activación de linfocitos T.

Investigador Principal:	Alemany, Susana, Investigador Titular
Investigadores Asociados:	Calvo, Víctor, Profesor Asociado UAM
Personal de Apoyo:	Pérez, Joaquin (desde 1999)
Becarios Postdoctorales:	Hernando, Raquel (desde 1999)
Becarios Predoctorales:	Velasco, Ana Gándara, María Luisa de Gregorio, Rosa Valero, Isabel
Colaboraciones:	Gamallo, Carlos, Hospital la Princesa, Madrid Palacios, José, Hospital La Paz, Madrid

Palabras Clave

COT/Tpl-2, Mkkk, linfocitos, oncogén, Eph

Activación y función de COT/TPL-2 quinasa en la activación de linfocitos T.

Recientemente hemos implicado a COT/Tpl-2 quinasa en la transición G0/G1 del ciclo celular de linfocitos T y actualmente estamos estudiando

1) La implicación de COT quinasa en la transición G1/S del ciclo celular de linfocitos T y su implicación en la regulación de ciclooxigenasa 1 y ciclooxigenasa 2, que inhiben la proliferación de la células T. (A. Velasco; R. de Gregorio)

2) La inducción de los niveles mRNA mensajero de COT quinasa en la activación de células T y caracterización del promotor. (R. de Gregorio)

3) La regulación del estado de fosforilación de COT/Tpl-2 y su posible cambio de actividad. (R. Hernando; M. Gandara)

Regulación de la producción de prostaglandinas por Metamizol.

El paso limitante en la síntesis de prostaglandinas es la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas, paso que esta catalizado por dos isoenzimas COX-1 y COX-2.

Recientemente se ha establecido que la inhibición de regulación de la COX-1 por antiinflamatorios no esteroídicos es responsable de los efectos renales, gástricos y anticoagulantes, mientras que la actividad antiinflamatoria/analgésica de dichas drogas se debe a la inhibición de la COX-2. En el laboratorio estamos evaluando la especificidad del Metamizol (nolotil) en la inhibición de ambas isoenzimas.(J. Perez)

Papel de los receptores Eph y sus ligandos, las ephrinas, en el Sistema Inmune

(I. Valero, V. Calvo)

Los receptores tirosina quinasa del tipo Eph tiene como ligandos las ephrinas, ancladas en la membrana mediante una unión tipo glicofosfatidilinositol (GPI), o mediante un único segmento transmembrana. Las funciones de los receptores Eph y las ephrinas parecen más relacionados con adhesión, migración y diferenciación que con proliferación: participan en la

guía de los axones de las neuronas a sus células diana, en etapas tempranas del desarrollo embrionario de vertebrados y en la distinción entre las arterias y las venas en el desarrollo embrionario.

La detección de mRNAs de algunos receptores Eph y ephrinas en órganos linfoides sugiere su posible participación en la ontogenia y las funciones del Sistema Inmune. La hipótesis de trabajo de este proyecto es que la interacción entre los receptores Eph y las ephrinas participe en las interacciones de los linfocitos T con los diferentes tipos celulares que regulan su diferenciación, activación y funciones efectoras (células del estroma tímico, células presentadoras de antígeno y células diana, respectivamente).

Actualmente estamos analizando:

1. La expresión de varios receptores Eph y ephrinas en linfocitos T y células epiteliales tímicas.
2. La activación de rutas de transducción de señales tras la estimulación de receptores Eph en estos tipos celulares.
3. La modulación de la adhesión celular por la estimulación de receptores Eph en estos tipos celulares.

Publicaciones

Ballester, A., Velasco, A., Tobeña, R. and Alemany, S. (1998) Cot kinase TNF- α gene expression activation in a Cyclosporin A resistant pathway. *J.Biol.Chem.* 273, 14099-14106

Campos, C., de Gregorio, R., García-Nieto, R., Gago, F., Ortiz, P., and Alemany, S. (1999) Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur.J.Pharmacol.* 378, 339-347.

Nombre del proyecto: Mecanismos moleculares de la poliploidización megacariocítica.

Investigador Principal:	Calés Bourdet, Carmela, Profesora Titular Departamento de Bioquímica
Becarios Postdoctorales:	García Rodríguez, Paloma (1997-1998) Ballester Jareño, Alicia (desde 1997)
Becarios Predoctorales:	Pérez Capilla, Tatiana (desde 1998)
Colaboraciones:	Frampton, Jonathan, Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK Bornstein Sánchez, Rafael, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras Clave

ciclo celular, replicación del DNA, megacariocitopoyesis

Papel de las ciclinas e inhibidores implicados en la transición G1/S en el establecimiento de la endorreplicación megacariocítica.

(P. García y T. Pérez)

Para que se establezcan ciclos de endorreplicación (entrada en sucesivas fases S sin división celular concomitante), el control de la transición G1/S debe estar necesariamente regulado en las células que se hacen poliploides. El sistema experimental utilizado consiste en el análisis comparativo de dos líneas celulares humanas (HEL y K562), que responden a ésteres de forbol diferenciando hacia formas maduras megacariocíticas; no obstante, mientras las primeras establecen ciclos de endorreplicación, las K562 no lo hacen. Hemos determinado que el establecimiento de dichos ciclos parece estar controlado por los niveles y actividades relativos del complejo ciclina E-cdk2 y de su inhibidor p27^{kip1}. Además, la expresión ectópica de ciclina E determina la poliploidización de las células que no endorepican. En la actualidad, estamos estudiando el efecto de la sobre-expresión condicional de los inhibidores p27^{kip1} y p21^{cip1} en las células HEL, que sí establecen dichos ciclos truncados.

Regulación transcripcional de la poliploidización megacariocítica.

(A. Ballester, J. Frampton, C. Calés)

En otros sistemas celulares en los que se establecen de manera fisiológica ciclos de endorreplicación del DNA, y concretamente, en *Drosophila melanogaster*, los endociclos que llevan a la poliploidización de células embrionarias y larvianas son controlados por un programa transcripcional que responde a señales ontogénicas. Nuestra hipótesis es que, de manera análoga, y durante la diferenciación megacariocítica, un programa transcripcional, dirigido por señales de diferenciación de este linaje hematopoyético, determina la poliploidización del megacariocito maduro. En una primera aproximación, hemos determinado que la función inhibidora que ejerce el represor transcripcional *esg* sobre los endociclos de *Drosophila*, se mantiene en la diferenciación megacariocítica, cuando se expresa ectópicamente en células HEL. En estos momentos estamos concentrando nuestros esfuerzos en identificar homólogos funcionales humanos, así como en determinar el mecanismo molecular por el cual estos factores inhiben la poliploidización megacariocítica.

Estudio de los reguladores del ciclo celular en cultivos primarios de megacariocitos humanos.

R. Bornstein, C. Calés

La sangre de cordón umbilical (SCU) de fetos a término supone una excelente fuente de células hematopoyéticas capaces de repoblar la médula ósea (MO) a corto y largo. Sin embargo, presenta una limitación en cuanto a la recuperación plaquetaria, sensiblemente menor que fuentes hematopoyéticas adultas (MO y sangre periférica de adultos, SPA). Nuestra hipótesis contempla que esta distinta capacidad está relacionada con una diferente maduración megacariocítica y, más concretamente, con una menguada capacidad de poliploidización de los megacariocitos (Mk) fetales. Utilizando cultivos primarios de megacariocitos de SCU y de SPA, hemos podido concluir que los Mk tienen una menor capacidad de maduración terminal, sin alcanzar ploidías superiores a 4N, mientras que los Mk adultos son capaces de llevar a cabo al menos 4 ciclos endomitóticos, alcanzando ploidías de hasta 64N. En estos momentos, estamos comprobando si la regulación de la expresión y funcionalidad de las ciclinas e inhibidores observada en las líneas celulares estudiadas se reproduce en los megacariocitos primarios.

Publicaciones

Raab U., Velasco B., Lastres P., Letamendia A., Calés C., Langa C., Tapia E., Lopez-Bote JP., Paez E. y Bernabeu C. (1999) Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem. J.*, 339, 579-588 .

Lerga, A., Crespo, P., Berciano, M., Delgado, M. D., Cañelles, M., Calés, C., Richard, C., Ceballos, E., Gutiérrez, P., Ajenjo, N., Gutkind, S., and León, J. (1999). Regulation of c-Myc and Max in megakaryocytic and monocytic-macrophagic differentiation of K562 cells induced by protein kinase C modifiers: c-Myc is down-regulated but does not inhibit differentiation. *Cell Growth Differ.* 10, 639-654.

Tesis doctorales

Paloma García Rodríguez

“Mecanismos moleculares de la endorreplicación en la diferenciación megacariocítica”.

Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Año 1997. Directora: Carmela Calés Bourdet. Calificación: Apto "cum laude".

Resonancia Magnética en Medicina y Biología

Investigador Principal:	Cerdán García-Esteller, Sebastián, Científico Titular
Investigadores Asociados:	Ballesteros García, Paloma, Catedrática Universidad, Departamento de Química Organica y Biología, U.N.E.D, Madrid. Roda Frade, José María, Médico Adjunto, Unidad Investigación Cerebrovascular, Hospital Universitario La Paz.
Personal de Apoyo	Llorens, Sergio (1998)
Becarios Postdoctorales:	Cruz Fernandez-Castañeda, Fátima
Becarios Predoctorales:	Álvarez Pérez, José García Martín, María Luisa García Espinosa, María Antonia Morales Arcia, Francisco Pascual Garvi, José María (Médico Interno Residente)
Colaboraciones:	Gillies, Robert J., University of Arizona, Tucson, USA Remy, Chantal, INSERM U-438, Université Joseph Fourier, Grenoble, France Dölle, Andreas, Rheinische Westfälischen Technische Hochschule (RWTH), Aachen, Germany
Investigadores Visitantes:	Stürtz, Laszlo y Seipelt, Crista (RWTH). Herigault, Gwenaëll, Ziegler, Ann y Coles, Jonathan (INSERM U-438) García Pérez, Ana (Universidad de Alcalá de Henares).

Palabras Clave

MRS, MRI, Neurona, Glia, Cancer, Redes Neuronales

Regulación del pH en tejidos transformados

(M.L. García Martín, J. Alvarez, R.J. Gillies, G. Herigault, A. Ziegler, J. Coles, P. Ballesteros, S. Cerdán)

Este proyecto investiga la regulación del pH intra- y extracelular durante la carcinogénesis experimental y en tumores in vivo. Se ha determinado en el hígado perfundido de ratón inducido con tioacetamida, el papel relativo de diversos procesos que contribuyen a la acidificación extracelular, el intercambiador Na^+/H^+ , los transportadores de bicarbonato sensibles al DIDS o SITS y la actividad de la anhidrasa carbónica. Entre todos ellos, la anhidrasa carbónica parece ser el principal contribuyente a la alcalinización intracelular en tumores, muy por encima de la actividad del antitransportador Na^+/H^+ o de los transportadores de bicarbonato.

Por otro lado se han obtenido las primeras imágenes del pH extracelular en tumores in vivo, empleando una sonda de pH desarrollada íntegramente en nuestro grupo de investigación. Las imágenes revelan un pH extracelular heterogéneo en los tumores, más ácido en el centro, con valores en el rango 6.8-6.5. Se ha demostrado el método con tumores mamarios MDA-435 implantados en el flanco de ratas o con gliomas C6 implantados en cerebro. El procedimiento está patentado y transferido a la industria farmacéutica.

Interacciones metabólicas Neurona-Glia en el cerebro adulto

(F. Cruz, J.M. Pascual, M.A. García-Espinosa, J.M. Roda, S., Cerdán)

Se ha estudiado la localización intercelular del sistema de reciclaje de piruvato y se han determinado cuantitativamente los flujos netos de intercambio de glutamato, glutamina y GABA entre neuronas y astrocitos en el cerebro adulto de rata. El reciclaje de piruvato contribuye aproximadamente el 30% del flujo a través del ciclo tricarboxílico neuronal, la transferencia de glutamina a las neuronas equilibra estequiométricamente la transferencia de glutamato a los astrocitos con un valor de 0.1 mmol/g peso húmedo.min. En situaciones patológicas como la isquemia cerebral focal se producen alteraciones importantes de estos flujos, con un aumento en la contribución del reciclaje de piruvato y de la transferencia de glutamato a la glia. Una extensión del trabajo investiga el efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina sobre las interacciones metabólicas neurona-glia.

Organización intracelular del metabolismo

(J. Alvarez, A.García Pérez, S. Cerdán)

Este proyecto estudia las restricciones que imponen a la difusión del agua y otros metabolitos, las membranas intracelulares o la presencia de biomoléculas de diverso tamaño. El estudio ha revelado que los movimientos traslacionales del agua y metabolitos de diámetro inferior a 4.5 Å, están más impedidos por metabolitos de su propio tamaño que por macromoléculas de mayor tamaño y movilidad más lenta. Se ha descrito un parámetro de obstrucción molecular que permite describir cuantitativamente la difusión de un metabolito.

Estructura del agua en medios biológicos

(J. Alvarez, S. Cerdan)

Hemos investigado si todo el agua celular o tisular resulta detectable a la resonancia magnética. Los resultados indican que existe una cantidad de agua de solvatación en las soluciones de iones y macromoléculas que es invisible a la RM en condiciones normales de adquisición. Este agua estructurada aparece en dos fases, una en contacto directo con el soluto y otra alejada del mismo por al menos una capa de moléculas de agua. Ambas fases del agua tienen propiedades de dinámica molecular y termodinámica diferentes.

Diagnóstico inteligente de tumores mediante Resonancia Magnética

(F. Morales, J.M. Pascual, J.M. Roda, S. Cerdán)

Este proyecto desarrolla un sistema experto que diagnostica tumores cerebrales humanos empleando redes neuronales y análisis estadísticos multivariantes. Se ha construido una base de datos con biopsias de 200 tumores cerebrales pertenecientes a las clases de gliomas de alto grado, gliomas de bajo grado, cerebro normal, meningiomas, meduloblastomas, oligodendrogliomas, neurinomas, y metástasis. Estos tumores se obtuvieron mediante intervención quirúrgica en los Hospitales de la Comunidad de Madrid, que proporcionaron el diagnóstico anatomopatológico. De cada biopsia se ha obtenido su espectro de resonancia magnética y su perfil de aminoácidos seleccionando las variables más apropiadas para la distinción mediante análisis multivariante o mediante redes neuronales. El sistema experto desarrollado proporciona en todos los casos un porcentaje de aciertos en el diagnóstico superior al 80% y en muchas comparaciones es capaz de obtener el 100% de aciertos, sin intervención alguna de operadores humanos.

Publicaciones

Pascual, J.M., Carceller, F., Roda, J.M., Cerdán, S. (1998) Glutamate, glutamine and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats.

Stroke 29, 1048-1057.

- Cruz,F., Scott,R., Barroso,I., Santisteban,P., Cerdán,S. (1998) Ontogeny and cellular localization of the pyruvate recycling system in rat brain. *J. Neurochem.* 70,2613-2619.
- Pascual,J.M., Carceller,F., Cerdán,S. and Roda,J.M. (1998) Diagnóstico de tumores cerebrales “in vitro” por espectroscopía de Resonancia Magnética de protón. Método de los cocientes espectrales. *Neurocirugía* 9, 4-10.
- Maxwell, R.S., Martinez-Pérez, I., Cerdan, S., Cabañas,M., Arús, C., Moreno, C., Roda, J.M., Carceller, F., Pascual, J.M., Howells, S.L., Mazucco, R. and Griffiths, J.R. (1998) Pattern Recognition Analysis of ^1H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumour biopsies. *Mag. Res. in Med.* 39, 869-877.
- Gray,H., Maxwell,R.J., Martinez-Pérez,I., Arús,C., Cerdán,S.(1998) Genetic Programming for classification and feature selection: analysis of ^1H NMR spectra from human brain tumor biopsies. *NMR in Biomedicine* 11, 217-224.
- García-Martín,M.L., García-Espinosa,M.A., Cerdán,S. (1998) Biochemistry detectable by NMR. En *Methodology, Spectroscopy and Clinical MRI*, Cerdan,S., Haase,A., Terrier, F. Eds. Springer. pg 3-13
- García-Pérez,A.I., Lopez-Beltran,E., Klünner,P., Luque,J.,Ballestros,P.,Cerdán,S. (1999) Subcellular compartmentation and molecular crowding as determinants of intracellular diffusion of metabolites *Arch. Biochem Biophys* 362, 329-338.
- Van Sluis, R., Bhujwala,Z., Raghunand,N., Ballesteros,P., Alvarez,S., Cerdán,S., Gallons,J.P., Gillies,R.J. (1999) *In vivo* Imaging of extracellular pH in tumors using ^1H MRSI. *Mag. Res. Med.* 41, 743-750.
- López,P., Seipelt,C.G., Merklng,P., Sturz,L., Alvarez,J., Dölle,A., Zeidler,M., Cerdán,S., Ballesteros,P. (1999) N-(Azol-1(2)-yl)ethyliminodiacetic acids: a novel series of Gd(III) chelators as T2 relaxation agents for Magnetic Resonance Imaging. *Bioorg. & Med. Chem.* 7, 517-527.
- Morales,F., Ballesteros,P., Cerdán,S. (1999) Neural Networks in Automatic Diagnosis malignant brain tumors. *Engineering Applications of Bio-Inspired Artificial Neural Networks*. Mira,J. Ed., Springer, pp 778-787.
- Cruz,F., Cerdán,S. (1999) Quantitative studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain as detected by ^{13}C NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 12: 1-12.
- Pestaña A, Cerdán S. (1999) La resonancia magnética nuclear en España. *Mundo Científico* 206, 70-75

Tesis Doctorales

José Alvarez Pérez

Fundamentos del contraste en imágenes por Resonancia Magnética Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, (1999) Director: Sebastián Cerdán. Calificación: Sobresaliente cum laude

José María Pascual Garvi

Interacciones neurona-glía durante la isquemia cerebral focal detectadas por Resonancia Magnética de ^{13}C . Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 1999. Directores: José María Roda Frade y Sebastián Cerdán. Calificación: Sobresaliente cum laude.

Estudio de la función de la caseína kinasa tipo I en *Dictyostelium discoideum*

Investigador Principal: Fernández Martín Margarita, Profesor Titular UAM

Becarios Predoctorales: Moreno Bueno, Gema

Colaboraciones: Renart, Jaime, IIB
Escalante, Ricardo, IIB

Personal de Apoyo: Dominguez, Carmen

Palabras Clave

Dictyostelium, protein kinasa, clonaje, transformantes

Estudio de la función de la caseína kinas I de *Dictyostelium*

(Gema Moreno, C. Calés, M. Fernández)

El propósito de este proyecto ha sido estudiar la función de una caseína kinasa I en *Dictyostelium*, para ello hemos clonado y caracterizado una CKI de este organismo utilizando una genoteca de cDNA. Existe un gen único que codifica para esta proteína y la expresión de este gen no cambia significativamente durante el ciclo vital de este organismo. La secuencia predicha tiene una homología de un 70% con la zona catalítica de las isoformas α y β de mamíferos y de un 65% con la isoforma Hrr25 de *S. cerevisiae*. La generación de anticuerpos contra una versión truncada de esta proteína nos ha permitido estudiar la localización subcelular de la misma, así como confirmar que existe una actividad caseína kinasa endógena que es reconocida por los anticuerpos. Hemos utilizado un abordaje genético para estudiar su función. Hemos intentado obtener clones estables con el gen interrumpido, utilizando una construcción en la que la zona codificante se ha interrumpido con una cassette de resistencia al antibiótico blasticidina, después de varias transfecciones independientes, en todos los clones obtenidos que presentaban resistencia al antibiótico, el gen endógeno estaba aun presente, lo que sugiere que este gen es esencial para la fase vegetativa de crecimiento de este organismo. También hemos hecho experimentos de sobreexpresión, utilizando en este caso como selección genética. Hemos obtenido varios clones que sobreexpresan la proteína, estos clones no tienen un fenotipo obvio diferente del de la cepa salvaje. Nosotros hemos encontrado en uno de los clones analizados una mayor resistencia a agentes que dañan el DNA como hidroximetilglucosilaminas. Para obviar el problema que ha supuesto la interrupción de este gen estamos en la actualidad utilizando otros abordajes complementarios: a) Estamos obteniendo transformantes con una construcción en la que se ha clonado una versión alterada del gen CKI (se ha mutado un Aa esencial para la función kinasa, para crear un teórico dominante negativo) bajo el control de genes que solo se expresan durante el proceso de diferenciación y no durante la fase vegetativa. b) Estamos realizando una construcción en la que se ha deleccionado la zona reguladora carboxilo terminal (putativo dominante positivo) del gen para estudiar el fenotipo de los transformantes que se obtengan.

Tesis doctorales

Gema Moreno Bueno

“Clonación y caracterización de una isoforma de caseína quinasa tipo I en *Dictyostelium discoideum*”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Año 1999.

Directora: Margarita Fernández. Calificación: Sobresaliente “Cum laude”

Regulación celular por proteólisis

Investigador Principal: González Castaño, José, Catedrático de Universidad
Investigadores de Sagarra Conde, Rosa, Titular de Universidad
Personal de Apoyo Oliva Mayor, Joaquín
Becarios Predoctorales: Rodríguez-Vilariño, Susana
Mayo Melchor, Isabel
Colaboraciones: Mayor, Federico, CBM Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid
Carrascosa, Jose María. CNB. CSIC. Cantoblanco. Madrid
Knecht, Erwin. Instituto de Investigaciones Citológicas. Valencia

Palabras Clave

Proteasoma, ClpP, proteólisis, protein kinasa, procesamiento

Procesamiento proteolítico limitado por el proteasoma 20S.

(S. Rodríguez-Vilariño, J. Oliva, J.G. Castaño)

La actividad del proteasoma esta considerada como responsable de la degradación total de sus proteínas sustrato. Hemos demostrado (en colaboración con el grupo de Federico Mayor CBMSO, Madrid) que el proteasoma es capaz de procesar de forma limitada la proteína kinasa GRK2 involucrada en la señalización de receptores β -adrenérgicos. Las conclusiones más significativas son: a) GRK2 es sustrato in vitro del proteasoma 20S. El proteasoma produce un corte proteolítico limitado de GRK2 que mediante anticuerpos específicos hemos localizado en la región NH_2 -terminal de la proteína. b) El corte proteolítico limitado de GRK2 produce una proteína de 74 kDa cuya actividad catalítica es menor que la proteína kinasa nativa. Por tanto, el ataque proteolítico limitado de GRK2 por el proteasoma conduce a su inactivación parcial. c) La señalización por receptores β -adrenérgicos produce el corte proteolítico limitado de GRK2 y lleva a su vez a la ubiquitilación y posterior degradación por el proteasoma.

Procesamiento proteolítico limitado de las subunidades α en el ensamblaje del proteasoma.

(S. Rodríguez-Vilariño, J. Oliva, J.G. Castaño).

El proteasoma es un heterodímero $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ constituyendo un cilindro formado por cuatro anillos. Algunas de las subunidades β del proteasoma sufren un procesamiento proteolítico en el extremo NH_2 terminal para su incorporación en el complejo 20S. Hemos estudiado el procesamiento de la subunidad C5 que se sintetiza como un precursor de 25 kDa siendo posteriormente convertido a un polipéptido de 23 kDa. El estudio de la conversión in vivo en células marcadas con ^{35}S metionina/cisteína ha permitido encontrar que el precursor se encuentra libre en el citoplasma y que la forma de 23 kDa se encuentra asociada con complejos 15S y 20S del proteasoma. El procesamiento es concomitante con su incorporación al complejo, es dependiente de la actividad del proteasoma y tiene lugar en el citoplasma de la célula. Estos resultados demuestran que la hipótesis de la formación de un precursor "medio proteasoma" ($\alpha_7\beta_7$) en el proceso de ensamblaje, no es válida para todas las subunidades β del proteasoma

HClpP, el homólogo humano de la proteasa ClpP de *E. coli*.

(R. de Sagarra, I. Mayo, S. Rodríguez-Vilariño, J. Oliva, J.G. Castaño).

Hemos clonado y expresado la proteína homóloga a la proteasa EClpP de bacterias. La HClpP, se localiza en la mitocondria en asociación con la membrana interna mitocondrial (en colaboración con el grupo de Erwin Knecht, Instituto de Investigaciones Citológicas. Valencia) y esta formada por 2 anillos cada uno con 7 subunidades (26 kDa) (en colaboración con el grupo de José Luis Carrascosa, CNB, CSIC, Madrid) y un peso molecular nativo de 340 kDa.

Publicaciones

Penela, P., Ruiz-Gomez, A., Castaño, J.G., and Mayor, F., Jr. (1998). Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 35238-35244.

de Sagarra, M.R., Mayo, I., Marco, S., Rodriguez-Vilarino, S., Oliva, J., Carrascosa, J.L., and Castano, J.G. (1999). Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J. Mol. Biol.* 292, 819-825.

La familia Src en la proliferación y diferenciación celular inducida por citoquinas

Investigador Principal:	Martín-Pérez, Jorge, Científico Titular
Becarios Postdoctorales:	Fresno Vara, Juan Ángel Martínez Muñoz, Raúl
Becarios Predoctorales:	Dominguez Cáceres, María Aurora Blanco Chapinal, Soledad (desde el 10/99)
Colaboraciones:	Fagard, Remi. Universidad Réne Descartes, Paris. Rodriguez Marcos, Miguel Angel. CBMSO, Madrid. Silva, Augusto. CIB (CSIC), Madrid.

Palabras Clave

Receptores de citoquinas, prolactina, tirosinas quinasa (Src, Jak), proliferación y diferenciación celular, células normales y tumorales

Resumen

Las citoquinas modulan un gran número de funciones fisiológicas a través de la interacción y activación de sus receptores. Estos, aunque no poseen actividad enzimática, tras la interacción con su ligando, dimerizan y activan a las tirosinas quinasa preasociadas de las familias Jak y Src, lo que provoca un aumento en la fosforilación en tirosina de proteínas celulares, incluyendo al propio receptor y a moléculas reguladoras de la actividad celular. De esta manera las citoquinas controlan procesos de supervivencia, proliferación y/o diferenciación celular.

Nuestro interés se centra en analizar la importancia biológica de la asociación y activación de la familia Src por prolactina. La estimulación del receptor de prolactina conlleva la de las tirosinas quinasa Src y Jak2. La estimulación de Src no está implicada en la de Jak2 o en la fosforilación del receptor, y viceversa, la actividad de Jak2 no es necesaria para la de Src; sin embargo, ambos eventos que emanan de la estimulación del receptor de manera independiente, son esenciales para la proliferación celular. La prolactina actúa como inmunomodulador, su receptor se detecta en estadios muy tempranos de la diferenciación de linfocitos B y su expresión aumenta progresivamente hasta la célula B madura, en donde la prolactina actúa como un mitógeno. La expresión exógena de receptores de prolactina en la línea celular de prolinfocitos B de ratón BaF-3 hace que la prolactina induzca la expresión de genes de diferenciación de linaje B (15 o la subunidad α del receptor de IL-2) así como de la proteína anti-apoptótica bcl-2. De hecho, la prolactina favorece la expansión de las células B en cultivos de médula ósea. En su conjunto, estos datos indican que la prolactina junto con otras citoquinas y hormonas modula el desarrollo de las células B.

Existen múltiples datos que apoyan la importancia de la prolactina en el cáncer de mama. En la línea tumoral T47D, la prolactina aumenta la fosforilación en tirosina de proteínas de los complejos de adhesión focal (FAK y paxilina), estimula la actividad de las MAPKs y la proliferación celular. El uso de inhibidores de las tirosinas quinasa Src abole estas acciones de la prolactina, lo que indica que estas quinasa desempeñan un papel esencial en la mediación de la acción de la prolactina sobre la proliferación y en los cambios morfológicos de las células de cáncer de mama humano T47D.

Por todo lo anteriormente expuesto, nuestros experimentos se dirigen a aumentar nuestros conocimientos sobre el papel de las quinasa Src y Jak, y de la fosforilación del receptor de prolactina en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

Publicaciones

- Velasco, J.A., Acebrón, A., Zannini, M., Martín-Pérez, J., Di Lauro, R. y Santisteban, P. (1998) Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with an heterogeneous TTF-1 phosphorylation. *Endocrinology* 139: 2796-2802.
- Benes, C., Poitout, V., Marie, J.C., Martín-Pérez, J., Roisin, M.P. y Fagard, R. (1999) Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta cell line MIN6 and their implication in the regulation of the insulin gene transcription. *Biochem J.* 340: 219-225.
- Morales, P., Carratero, M.V., Gerónimo, H., Copín, S.G., Gaspar, M.L., Marcos, M.A.R. y Martín-Pérez, J. (1999) Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Diff.* 10:583-590.

Relaciones estructura/función en la metionina adenosiltransferasa hepática. Regulación del ciclo de la metionina.

Investigador Principal:	Pajares Tarancón, María de los Angeles (Científico Titular)
Investigadores Contratados:	Alvarez García, Luis
Personal de Apoyo	Garrido Pérez, Francisco
Becarios Postdoctorales:	Sánchez-Góngora, Estrella
Becarios Predoctorales:	López-Vara, M ^a Carmen (hasta octubre 1998)
Colaboraciones:	Gasset, María (Científico titular, Instituto de Química-Física Rocasolano) Sanz Aparicio, Juliana (Científico titular, Instituto de Química-Física Rocasolano) Pérez de Miguelsanz, Juliana (Profesora Titular, Universidad Complutense de Madrid) Rodríguez Arrondo, José Luis (Catedrático, Universidad del País Vasco)

Palabras Clave

Metionina adenosiltransferasa, betaina:homocisteína metiltransferasa, glutation, S-adenosilmetionina, plegamiento, estructura.

Relaciones estructura/función en la metionina adenosiltransferasa hepática.

(M.C. López Vara, Alvarez,L., F. Garrido, M.A. Pajares)

Estudiamos la estructura de la metionina adenosiltransferasa hepática (dímeros y tetrámeros), su plegamiento y el efecto de mutaciones en la estructura y función de la enzima. Para la realización de los estudios estructurales colaboramos con los grupos del Prof. Rodríguez Arrondo y de los Drs. Martínez Ripoll y Sanz Aparicio. Hasta el momento se ha conseguido resolver la estructura de la forma tetrámerica de la proteína y localizar el sitio de unión de metionina. Así mismo, se ha localizado la presencia de un puente disulfuro en la proteína cuyo papel en la oligomerización esta siendo estudiado. Se ha establecido una ruta de plegamiento para la enzima, y se ha identificado un intermediario en la misma que está siendo caracterizado.

Regulación del ciclo de la metionina.

(E. Sánchez-Góngora, L. Alvarez, M.A. Pajares)

Se estudia la regulación de las enzimas del ciclo tanto a nivel de actividad como a nivel transcripcional, utilizándose para ello tanto células en cultivo como modelos animales. Parte de los estudios se llevan a cabo en colaboración con la Dra. Pérez de Miguelsanz.

Relaciones estructura/función en la betaína: homocisteína metiltransferasa hepática.

(E. Sánchez-Góngora, Alvarez,L., F. Garrido, M.A. Pajares)

Estamos empezando el estudio de la estructura de la betaína:homocisteína metiltransferasa hepática en colaboración con los Drs. Martínez Ripoll y Sanz Aparicio, para lo cual ha sido necesaria la sobreexpresión de la proteína y el diseño de un método de purificación.

Publicaciones

Alvarez,L., Gil-Pérez,B., Pajares,M.A., Mato,J.M. (1998) Regulation of hepatic methionine adenosyltransferase gene expression. En: Methionine metabolism. Molecular mechanism and clinical implications IV (Mato,J.M., Caballero,A., eds.). Jarpyo Editores (Madrid) pags. 17-22.

Caracterización de los efluentes peritoneales de enfermos de Insuficiencia Renal

Investigador Principal:	Vara, Francisco, Profesor Titular de Universidad
Investigadores Asociados:	Bajo, M ^a Auxiliadora, Medico Adjunto del Servicio de Nefrología, Hospital "La Paz" de Madrid. Selgas, Rafael, Jefe del Servicio de Nefrología, Hospital "La Princesa" de Madrid.
Personal de Apoyo	Molina Sánchez, Susana, Contratada de la U.A.M. (hasta 1999) Aguilera Peralta, Abelardo, Contratado de la U.A.M. (hasta 1999)
Becarios Predoctorales:	Cárcamo Valor, Cristina (hasta 1998) Castro Notario, María Angeles

Palabras Clave

CAPD, Efluentes peritoneales, Factores de crecimiento, Células mesoteliales, vEGF, Peritonitis.

Caracterización de células mesoteliales presentes en los efluentes peritoneales humanos

(S. Molina, M.A. Castro, M.A. Bajo, R. Selgas y F. Vara)

Los enfermos de Insuficiencia renal humana necesitan para vivir ser sometidos a diálisis externa. En la actualidad se usan dos procedimientos: el Riñón artificial y la Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (CAPD). Esta última consiste en introducir en el peritoneo del paciente un líquido preparado para provocar una diálisis por osmosis, aprovechando las capacidades ultrafiltrativas del propio peritoneo.

Para poder usar la CAPD se necesita que el peritoneo se encuentre en las mejores condiciones posibles. La última capa de células de esta serosa es una monocapa de células epiteliales de origen mesenquimal, llamada mesotelio. La integridad de esta capa es esencial no solo para poder usar esta técnica, sino que su ruptura daría lugar a una invasión de los fibroblastos que hay debajo de ella, dando lugar a una fibrosis, proceso irreversible que conduce a la muerte.

Nuestro grupo lleva unos años estudiando y caracterizando el líquido peritoneal de los pacientes en CAPD. El número de células peritoneales presentes en este líquido después de ocho horas de contacto con el peritoneo varía de un paciente a otro. Hemos visto que la mayor cantidad de células se da en los primeros meses tras iniciarse en CAPD. Después va disminuyendo hasta alcanzar un número estable para cada paciente, de manera que aunque entre pacientes hay grandes diferencias, para un enfermo dado su población mesotelial es muy constante, siempre que no haya ningún cambio fisiológico.

El número de células mesoteliales antes y después del primer pase no tiene relación con las características demográficas del paciente (edad, sexo o causa de la insuficiencia renal), pero sí hay una relación inversa con el tiempo en diálisis peritoneal. Cuanto más tiempo lleva el paciente con esta técnica, menos células presentan al final del primer pase y se necesitan más días para alcanzar la confluencia. También se observa una correlación inversa entre tiempo en diálisis y velocidad de crecimiento en el segundo pase en las placas multi pocillo. Curiosamente no se afectan ni por el número de episodios de peritonitis ni con los días de inflamación peritoneal acumulados. Un análisis de regresión muestra que los niveles de creatinina y urea están significativa y directamente relacionados con el número de células al final del primer cultivo.

Publicaciones

Díaz, C., Selgas, R., Castro, M.A. Bajo, M.A. Fdez de Castro, M. Molina, S. Jiménez, C. Ortiz, A. y Vara, F. (1998). Ex Vivo Proliferation of Mesothelial Cells Directly Obtained from Peritoneal Effluent: Its Relationship with Peritoneal Antecedents and Functional Parameters. *Adv. Perit. Dial.* 14, 19-24.

Tesis doctorales

Cristina Cárcamo Valor “Estudio longitudinal de los receptores de membrana de linfocitos, monocitos y macrófagos de sangre y efluente peritoneal de pacientes en tratamiento con diálisis peritoneal continua ambulatoria”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 1998. Director: Dr. Francisco Vara Pinedo. Calificación: Sobresaliente “Cum Laudem”

Departamento de Regulación de la Expresión génica

Regulación de la expresión génica por los receptores nucleares en células hipofisarias y neuronales: interacción con otros factores de transcripción y con factores mitogénicos y neurotróficos

Investigadora Principal:	Aranda, Ana, Profesora de Investigación
Personal de Apoyo:	Martínez de la Mata, Jorge (hasta Mayo 1999)
Investigadores Contratados:	Tolón, Rosa Sanchez-Pacheco, Aurora Nevado, Julian (desde Octubre 1999)
Becarios Postdoctorales:	Jimenez-Lara, Ana M. (hasta Septiembre 1998) Isabel Castillo, Ana
Becarios Predoctorales:	Pérez-Juste, Germán (hasta Enero 1999) Cañón, Estela García Silva, Susana (desde Septiembre 1998) Méndez Pertuz, Marinela (desde Enero 1999) Palacios, Daniela (desde Septiembre 1999)

Palabras Clave:

Regulación transcripcional, células hipofisarias, receptores nucleares, factores de crecimiento, neurotrofinas, diferenciación neuronal.

Interacción de los receptores nucleares con otros factores de transcripción y con factores de crecimiento en la regulación de la expresión del gen de la prolactina.

(A.I. Castillo, D. Palacios, R. Tolón, A. Aranda)

Las líneas celulares hipofisarias productoras de prolactina (PRL) y hormona de crecimiento (GH), así como las células inmortalizadas que representan a los progenitores de dichas células, nos proporcionan un interesante modelo para investigar las bases moleculares de la interacción entre los receptores nucleares y otras vías de transducción de señales en la activación génica. Hemos demostrado que el bFGF es capaz de iniciar la expresión del gen de la prolactina en los precursores lactotropos a través de la activación de la vía de Ras/MAPK que a su vez fosforila factores Ets que se unen al promotor del gen. Diferentes ligandos de receptores nucleares incluyendo los estrógenos, las hormonas tiroideas (T3) o la vitamina D también estimulan la expresión de PRL en células diferenciadas. Estos receptores activan la transcripción a través de su unión a elementos de respuesta (HREs) localizados en la región 5' del gen y la estimulación requiere la unión de coactivadores como el SRC-1 o CBP, que poseen actividad acetilasa de histonas, al dominio de activación transcripcional AF-2 localizado en el extremo C-terminal del receptor. El efecto tanto de los ligandos de los receptores nucleares como de los receptores que activan Ras requieren la presencia del factor de transcripción específico de células hipofisarias GHF-1 (o Pit-1). Este factor interacciona directamente tanto con los receptores nucleares como con los factores Ets. A su vez, también hemos demostrado la interacción del CBP con el Ets y con el GHF-1. De esta forma la unión de los ligandos permitiría el reclutamiento de un multi-complejo transcripcional responsable de la expresión del gen. Hemos observado también que la interacción de los receptores nucleares con el factor Ets-1 induce un cambio conformacional en los receptores que permite la activación independiente de ligando y del dominio AF-2. Así, receptores que carecen del dominio AF2 son capaces de reclutar coactivadores en presencia de Ets-1. Estas observaciones demuestran la existencia de un mecanismo de activación, alternativo a la unión del ligando, que permite la conversión de un receptor vacío inactivo en un estimulador transcripcional.

Mecanismos de regulación transcripcional por los receptores nucleares

A. Jimenez-Lara, M. Méndez Pertuz, J. Nevado, A. Sanchez-Pacheco, A. Aranda

Los receptores nucleares en ausencia de ligando habitualmente producen una represión transcripcional que se debe a la unión de proteínas corepresoras. La unión del ligando causa la liberación de corepresoras y el reclutamiento de coactivadores. Utilizando como modelos diferentes promotores hemos observado que los receptores nucleares pueden regular la transcripción a través de mecanismos diferentes. Así, en el promotor de la GH, adyacente a la caja TATA existe un HRE negativo que media una respuesta paradójica. En este caso el receptor vacío aumenta la transcripción y el ligando revierte esta activación. La estimulación por el receptor vacío es independiente de la unión de coactivadores pero requiere el dominio de unión a corepresoras y un residuo conservado en la hélice 3 del dominio de unión al ligando. La acetilación de proteínas de la cromatina parece estar implicada en esta regulación ya que inhibidores de las deacetilasas aumentan el efecto mientras que la sobreexpresión de una deacetilasa lo inhiben. Estamos también analizando la interacción de receptores nucleares con diferentes componentes de la maquinaria transcripcional básica incluyendo ciertas TAFs o componentes del complejo de la holoenzima que podrían contribuir a la formación o estabilidad del complejo de iniciación transcripcional, así como al reclutamiento de estos factores al promotor. En algunos casos los receptores nucleares regulan de una forma "pasiva" la acción de otro receptor a través de la ocupación del HRE de éste último de forma transcripcionalmente improductiva. Este es el caso del promotor del receptor RAR α 2 que es activado por el RA y en el que la vitamina D reprime esta transactivación. Los receptores inactivos se unen sin polaridad definida al HRE del promotor RAR α 2, mientras que los heterodímeros activos lo hacen de forma que el receptor RXR ocupa el hemisitio 5' del HRE y su pareja el hemisitio 3'. La competición por coactivadores comunes también parece estar implicada en el antagonismo descrito ya que la delección del dominio AF2 del receptor reduce significativamente este antagonismo. Los receptores nucleares también pueden regular la transcripción génica a través del antagonismo o cooperación con otras vías de transducción de señales. Hemos observado que existe un "cross-talk" entre la vía de *ras* y los receptores nucleares en la regulación de algunos genes, y que los ligandos de los receptores nucleares modulan también la actividad de la vía del AMP cíclico a través de la regulación de la fosforilación del factor de transcripción CREB. Estos resultados indican la complejidad de la regulación transcripcional por los receptores nucleares en la que están implicados un gran número de proteínas y diferentes mecanismos.

Interacción de los receptores nucleares con factores neurotróficos y mitogénicos en la proliferación y diferenciación de células neuronales.

(E. Cañón, S. García-Silva, G. Pérez Yuste, A. Aranda)

Los receptores nucleares de T3 y RA parecen jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica en células neuronales que tiene como consecuencia la parada de la proliferación y la inducción de diferenciación morfológica. En células de neuroblastomas y en células PC12, el RA produce un aumento en la expresión del receptor RAR α 2. Esta inducción parece ser importante en la diferenciación neuronal, y otros factores neurotróficos, a través de una estimulación de Ras, inducen también la expresión de este receptor. Mientras que los efectos del RAR mapean en un HRE localizado cerca de la caja TATA, el efecto de Ras parece ejercerse directamente sobre componentes de la maquinaria basal de transcripción, ya que los ligandos que activan Ras alteran la unión de proteína a las secuencias de la TATA y el Iniciador del gen. Por otra parte, los efectos diferenciadores de la T3 en células de neuroblastoma están asociados a la inhibición de la fosforilación de la familia de proteínas de retinoblastoma Rb que es consecuencia de una inhibición de la actividad de los complejos ciclina-CDK2. Esta inhibición se debe a su vez a un aumento de los transcritos del inhibidor p27 y a una posterior estabilización de la proteína que causa un aumento fuerte y sostenido de los niveles p27, así como a una inhibición de la expresión de ciclina D1. Estos efectos están precedidos por una rápida represión de la expresión del oncogén *c-myc*. Este gen es un regulador central de la proliferación, aunque los mecanismos por los que regula el ciclo celular aún no se han aclarado.

completamente. Hemos localizado un HRE negativo el gen de *c-myc* "downstream" del sitio de inicio de transcripción. Dicho HRE se encuentra en la región responsable de la terminación prematura de la transcripción adyacente al sitio de unión del "insulator" CTCF. Por tanto el receptor de hormonas tiroideas participaría en la pausa y liberación de la RNA polimerasa II.

Publicaciones

- R. Tolón, A.I. Castillo and A. Aranda. (1998) Activation of the prolactin gene by peroxisome proliferator-activated receptor α appears to be DNA-binding independent. *J. Biol. Chem.* 273, 26652-26661
- T. Palomino, D. Baretino and A. Aranda. (1998) Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors *J. Biol. Chem.* 273, 27541-27547
- A. Sánchez-Pacheco, P. Peña, T. Palomino, A. Güell, J. L. Castrillo and A. Aranda. (1998) The transcription factor GHF-1/Pit-1, but not the splice variant GHF-2, cooperates with thyroid hormone and retinoic acid receptors in rat growth hormone gene expression. *FEBS Lett.* 422, 103-107.
- A. I. Castillo, R. M. Tolón and A. Aranda. (1998) Insulin-like growth factor 1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras-, Ets and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent mechanism. *Oncogene* 16, 1981-1991
- T. Palomino, A. Sánchez-Pacheco, P. Peña, and A. Aranda. (1998) A direct protein to protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *The FASEB J.* 12, 1201-1209
- J. M. Cosgaya, G. Pérez-Juste and A. Aranda. (1998) Retinoic acid regulates selectively the expression of immediate early response genes in PC12 cells. *FEBS Lett.* 429, 254-258
- J. M. Cosgaya, A. Aranda, J. Cruces and E. Martín-Blanco. (1998) Engrailed homeodomain promotes PC12 cell neuronal differentiation independently of MAPK activity. *J. Cell Science.* 111, 2377-2384
- J.M. Cosgaya and A. Aranda. (1999) The ras oncogene inhibits growth factor inducibility of early response genes, and promotes selectively expression of NGFI-A in a PC12 cell line. *FEBS Lett.* 329--332
- G. Pérez-Juste and A. Aranda. (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 274, 5026-5031
- Jiménez-Lara A.M and Aranda A. (1999) The vitamin D receptor binds in a transcriptionally inactive form and without a defined polarity on a retinoic acid response element. *The FASEB J.* 13, 1073-1081
- Jiménez-Lara A.M. and Aranda A. (1999) Lysine-246 of the vitamin D receptor is crucial for ligand-dependent interaction with coactivators and transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 274, 13503-13510
- Jiménez-Lara A.M. and Aranda A. (1999) Vitamin D represses retinoic acid-dependent transactivation of the retinoic acid-b2 promoter: the AF-2 domain of the vitamin D receptor is involved in transrepression. *Endocrinology* 140, 2898-2907
- Tolón R. Castillo A.I. Jimenez-Lara A.M. and Aranda A. (1999) Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators SRC-1 and CBP. *Mol. Endocrinol.* 13, 1141-1154

Pérez-Juste G. and Aranda A. (1999) Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor-1 is associated with induction of retinoic acid receptor gene expression. *Oncogene*. 18, 5393-5402

Tesis doctorales

Teresa Palomino Gutierrez "Mecanismos de regulación transcripcional del gen de la hormona de crecimiento de rata por las hormonas tiroideas y el ácido retinoico". Universidad Autónoma de Madrid. 1998. Directora: Ana Aranda. Calificación: Apto "Cum Laude"

Ana I. Castillo Varón "Regulación de la expresión del gen de prolactina por ligandos de receptores nucleares y de receptores tirosina quinasa". Universidad Autónoma de Madrid. 1998. Directora: Ana Aranda. Calificación: Apto "Cum Laude"

Germán Pérez Juste "Regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación y diferenciación de células de neuroblastoma por ácido retinoico y hormonas tiroideas". Universidad Autónoma de Madrid. 1998. Directora: Ana Aranda. Calificación: Apto "Cum Laude"

Función y control de la regulación de los genes de la paramiosina/ miniparamiosina y de la TnT en *Drosophila*

Investigador Principal: Cervera Jover, Margarita, Profesora Titular

Becarios Postdoctorales: Arredondo Lamas, Juan José
Más Gutierrez, José Antonio (hasta Octubre, 1998)

Becarios Predoctorales: Marco Ferreres, Raquel (desde Octubre de 1999)

Colaboraciones: Molano, Jesús, Hospital La Paz
Heinreich, Olaf, Universidad Tuebingen, Alemania
Bernstein, Sandford, Universidad San Diego, California USA

Palabras Clave

Genes musculares, Transcripción, Músculo, *Drosophila*

Control de la regulación de los genes de la paramiosina/miniparamiosina y de la TnT en *Drosophila*: Análisis *in vivo*

(J.J. Arredondo, J.A. Más Gutierrez, R. Marco Ferreres, y M. Cervera)

La regulación de la expresión de genes musculares es diferente a la de otros tipos de genes, y los genes de paramiosina/miniparamiosina y de troponina T de *Drosophila* son un buen modelo de estudio para contribuir al esclarecimiento de dicha regulación, tanto en *Drosophila* como probablemente en mamíferos. Además, el análisis del promotor de la mPM, que controla la expresión de una de las pocas proteínas musculares específicas de adultos, permitirá identificar tal vez nuevos factores de transcripción musculares que actúen exclusivamente en la etapa adulta, hasta hoy desconocidos. TnT y paramiosina son dos proteínas contráctiles que están localizadas en la misma estructura del sarcómero, pero en distinto filamento, y que además muestran un patrón de expresión espacio-temporal similar. La comparación de los elementos que regulan la expresión de estos dos genes permite conocer si existen elementos comunes que coordinen la expresión de las proteínas que integran una determinada estructura.

Para entender los mecanismos de regulación de la transcripción de estos genes a lo largo del desarrollo se ha llevado a cabo un estudio *in vivo* de transformantes en la línea germinal, obtenidos por inserción de elementos-P, de la expresión de β -galactosidasa, en los que se colocó este gen bajo el control de secuencias seleccionadas. El análisis de las líneas transgénicas dió como resultado que en el caso del gen de la PM/mPM, con la excepción de la expresión de la PM en los IFMs, el control de la transcripción, tanto a nivel espacial como temporal, de las dos unidades de transcripción, esta dirigida por dos regiones de unas 800 pb situadas en la región 5' distal del gen y en el intrón 7. La primera de estas regiones controla la expresión de la PM y la segunda la de la mPM. La región que controla la expresión de la PM consta de un solo modulo regulador con dos partes diferenciadas. La parte mas alejada es la responsable de su correcto funcionamiento en todos los músculos y en ella juega un papel esencial el sitio MEF2. La parte mas proximal del módulo realiza un papel de modulador positivo de la señal. Sin embargo, la región que controla la expresión de la mPM está dividida en, al menos, dos módulos. Cada uno de ellos controla la expresión de la proteína en una región diferente del cuerpo del animal adulto. El módulo AB es el responsable de la expresión abdominal de la proteína, y el BF2/Tx? de la expresión torácica. En este segundo módulo, el elemento BF2 tiene un papel esencial.

La regulación de la transcripción del gen de la TnT a lo largo del desarrollo se lleva a cabo por elementos presentes en la región 5' y en el intrón 1. Ambas regiones son capaces de dirigir la transcripción del transgen al mismo nivel y con la misma especificidad espacio-temporal,

excepto en los músculos de vuelo.

Cardiomiopatía hipertrófica familiar: caracterización de las mutaciones asociadas y desarrollo de un modelo experimental para el análisis funcional de los genes mutados

(J. J. Arredondo, J. Molano, y M. Cervera)

La Cardiomiopatía hipertrófica familiar (CHF) es la causa más común de muerte súbita en los jóvenes, es una enfermedad autosómica dominante que produce un incremento de la masa ventricular, es decir hipertrofia ventricular acompañada por desorganización miofibrilar en el sarcómero. Su penetrancia es muy variable, aun dentro de una misma familia. La causa más común de la CHF son mutaciones de "cambio de sentido" en genes que codifican proteínas estructurales musculares (β -miosina cardiaca, α -tropomiosina, troponina T cardiaca, troponina I cardiaca, proteína C y las cadenas ligeras de la miosina). La mayor parte de los estudios que correlacionan mutación y fenotipo han sido realizados con la β -miosina cardiaca y nada se conoce de esta correlación en los componentes del complejo troponina-tropomiosina.

Se está llevando a cabo un estudio detallado de mutaciones asociadas a la cardiomiopatía hipertrófica familiar con objeto de establecer protocolos adecuados para su diagnóstico y estudiar el efecto que provocan en el corazón con el fin de establecer correlaciones entre la mutación y el fenotipo y por otro lado establecer un sistema modelo para CHF para caracterizar de una manera mucho más fácil y simple la correlación existente entre cada mutación y el fenotipo muscular generado. Esta información nueva puede ser aplicada en el diagnóstico de pacientes afectados al facilitar la clasificación de estas cardiomiopatías simplemente por el estudio del fenotipo. El modelo que se ha propuesto es el músculo indirecto de vuelo de *Drosophila*. Estos músculos presentan dos ventajas muy importantes para su utilización como modelo de estudio de CHF: 1) necesitan pequeños esfuerzos para su completa activación lo que se conoce como "activación por tensión" igual que el músculo cardiaco de vertebrados y 2) son dispensables.

Publicaciones

Domingo, A., González-Jurado, J., Maroto, M., Diaz, C., Vinós, J., Carrasco, C., Cervera, M. & Marco, R. (1998). Troponin T is a calcium binding protein in insect muscle: *In vivo* phosphorylation, muscle specific isoforms and developmental profile in *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. & Cell Motil.* 19, 393-403

Benoist, P., Mas, J. A., Marco, R. & Cervera, M. (1998). Differential muscle-type expression of the *Drosophila* Troponin T gene: A 3 base-pair microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification. *J. Biol. Chem.* 273, 7538-7546

Marco, R. & Cervera, M.. Estructura y función muscular. (1998). En Tratado de Reumatología, 1., (E. Pascual Gomez, V. Rodriguez Valverde, J. Carbonell Abelló, J.J. Gomez-Reino) Editorial ELA, Madrid. Volumen 1, pp 857-868

Tesis doctorales

Juan Jose Arredondo Lamas

"Regulación transcripcional del gen de la paramiosina/miniparamiosina de *Drosophila melanogaster*. Análisis funcional de la miniparamiosina". 1999. UAM. Facultad de Ciencias Biológicas. Directora: M. Cervera Calificación: Sobresaliente "cum laude"

José Antonio Más Gutierrez

"El gen de la Troponina T de *Drosophila melanogaster*: Expresión diferencial y regulación transcripcional en el músculo". UAM. Facultad de Ciencias Biológicas. Directora: M. Cervera. Calificación: Sobresaliente "cum laude"

Caracterización de nuevos genes humanos y su posible implicación en enfermedades hereditarias.

Investigador Principal:	Cruces Pinto, Jesús
Investigador Asociado:	Pérez Jurado, Luis
Investigador Colaborador:	Coloma Jerez, Antonio (IIB)
Becarios Postdoctorales:	Cortés Ruiz, Arancha (desde enero 1999) Valero Quirós, Carmen (desde enero 1998)
Becarios Predoctorales:	de Luis Jiménez, Oscar (desde julio 1998)
Becaria 2º ciclo UAM:	Sesto Yagüe, Angela (hasta septiembre 1998)

Palabras clave

Genética Humana, Enfermedades hereditarias, Protein-O-manosiltransferasas, Distrofias musculares congénitas, Esclerosis lateral amiotrófica, Síndrome de Williams.

Estudio de la posible implicación del gen *POMT1* en distrofias musculares congénitas

(Luis Pérez Jurado, Arancha Cortés, Angela Sesto, Antonio Coloma, Jesús Cruces)

El gen *POMT1* es el ortólogo humano del gen "*rotated abdomen*" (*rt*) de *D. melanogaster*, cuya mutación homocigota recesiva es causante de anomalías musculares en la larva. Por tanto, mutaciones similares en humanos podrían ser la causa de algún tipo de distrofia muscular congénita (DMC). *POMT1* se localiza en 9q43.1, es de expresión ubicua, y codifica una proteína con una secuencia homóloga a las O-manosil transferasas de levadura (*Pmts*). Se trata del primer hallazgo de una proteína de este tipo en mamíferos. Actualmente, estamos investigando su posible implicación en ciertas distrofias musculares candidatas, entre las que se encuentran el Síndrome de Walker-Warburg y la distrofia muscular congénita con desmielinización sin déficit de merosina.

También hemos caracterizado el gen *Pomt1* murino ortólogo, y posicionado en el genoma de ratón. Actualmente estamos investigando si la distrofia muscular con miositis (*mdm*), que se ha posicionado en el ratón en proximidad a *Pomt1* podría ser causada por una mutación en este gen, mediante la secuenciación de *Pomt1* en este ratón mutante. Además, hemos iniciado los primeros pasos hacia la producción del "knock-out" de *Pomt1* en ratón, habiendo obtenido ya un clon genómico de ratón 129SvJ con este gen, e iniciado la construcción del fragmento a insertar en las células ES de ratón 129SvJ.

Estudio del gen "*twisted*" (*tw*) de *D. melanogaster*

(Luis Pérez Jurado, Jesús Cruces)

El gen "*twisted*" (*tw*) es el ortólogo de *Drosophila* del gen humano *POMT2*. Hasta el momento, parece ser que en eucariotes superiores solamente existen dos genes que codifiquen protein-O-manosil transferasas. Recientemente hemos caracterizado otra posible manosil transferasa en *Drosophila* localizada en el cromosoma X, justo en la zona donde se localiza el fenotipo mutante denominado "*twisted*", que como en el caso de "*rotated abdomen*" se caracteriza por una rotación del abdomen en mayor o menor grado según los mutantes

estudiados. A partir del único mutante que se mantiene en “stock” en la actualidad, hemos caracterizado su mutación, consistente en una inserción de una glicina y el cambio de serina por treonina, en la región más cercana al extremo amino, justo donde se predice que su secuencia de aminoácidos esté en la zona del lumen del R.E. o Golgi, donde se debe localizar el centro activo de esta enzima. Hemos caracterizado su estructura génica intrón/exón, región promotora, expresión durante el desarrollo, etc, y en la actualidad estamos estudiando las similitudes o diferencias en la estructura muscular de la mosca, respecto del mutante *abdomen rotated*. Además, estamos realizando la obtención del doble mutante tw/rt para comprobar su fenotipo y grado de afectación muscular.

Caracterización de gen *UHG62* humano y su posible implicación en enfermedades neurodegenerativas

(Luis Pérez Jurado, Jesús Cruces)

El gen contiguo centromérico a *POMT1* le hemos denominado *UHG62* (**U** Host Gene), por codificar en uno de sus intrones el snoRNA U62. Hasta el momento se han caracterizado 6 Kb de su RNA. Utilizando una sonda de la región 3' hemos demostrado la existencia de 2 mensajeros de 10 y 12 Kb respectivamente, que se expresan en todos los tejidos analizados. La región codificante de este gen tiene homología con otras 2 proteínas cuya función se desconoce, y cuyos genes se localizan en 6p21.3 y 1q23.1-24.3. Ambas tienen una zona muy rica en glutaminas en su extremo más amino-terminal, que en el caso de un clon EST de la parte más 5' de *UHG62* el tramo de poliglutaminas es continuo (23 repeticiones CAG seguidas). Este tipo de repeticiones puede sufrir expansión génica y aumentar el número de glutaminas, lo que lleva a la agregación y precipitación de la correspondiente proteína. Este hecho es la causa de bastantes enfermedades neurodegenerativas. Además, en esta región cromosómica 9q34.1 se ha posicionado un tipo de esclerosis lateral amiotrófica, que cursa con acúmulos protéicos en las células neuronales. Actualmente, estamos caracterizando el gen completo, y la posible implicación en de este gen en enfermos con esclerosis lateral amiotrófica ligada a 9q34.1.

Caracterización molecular del Síndrome de Williams y generación de un modelo en ratón

(Carmen Valero, Oscar de Luis, Jesús Cruces, Luis Pérez Jurado)

El síndrome de Williams-Beuren (SW) es un trastorno del desarrollo con manifestaciones multisistémicas que afectan fundamentalmente al sistema nervioso, al aparato cardiovascular y al tejido conectivo. Está causado por haploinsuficiencia para genes delecionados en la banda cromosómica 7q11.23. Hemos definido previamente que las deleciones son de tamaño casi idéntico en la mayoría de los pacientes, ocupando ~1.5 Mb de secuencia. Se han caracterizado las regiones flanqueantes al la deleción, donde existe una duplicación genómica que incluye el gen *GTF2I* y se está intentando identificar el punto exacto de rotura cromosómica. El mecanismo delecional en el SW es la recombinación desigual meiótica tras un mal alineamiento cromosómico propiciado por la citada duplicación genómica. Hemos identificado además varios genes incluidos en el intervalo delecionado, especialmente *TBL2* y *WBSCR14*, que codifican una proteína de la familia de las β -transducinas y un factor de transcripción β -HLH, respectivamente, y cuya hemigiosidad podría contribuir a alguno de los aspectos del fenotipo del SW.

En paralelo, se ha establecido el mapa de la región sinténica en el ratón y se ha determinado que el orden y orientación de todos los genes del intervalo delecionado en humanos se encuentra preservado en el ratón. Sin embargo, existe una inversión con respecto a los genes inmediatamente flanqueantes. Por tanto, parece que la duplicación en humanos se ha generado por un mecanismo de inversión-duplicación ocurrido en la evolución cromosómica. El mapa detallado de la región murina se está utilizando como para intentar generar un modelo de ratón con la misma deleción que el humano, mediante el sistema Cre-loxP de pasos sucesivos de recombinación homóloga en células ES.

Publicaciones

- Pérez Jurado, L.A., Wang, Y-K., Peoples, R., Coloma, A., Cruces, J. and Francke, U. (1998). A duplicate gene in the breakpoint of 7q11.23 Williams-Beuren Syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum. Mol. Genet.* 7, 325-334.
- Wang, Y-K., Pérez Jurado, L.A., Franke, U. (1998). Cloning of a mouse single copy gene, *Gtf2i*, the ortholog of human GTF2I that is duplicated in the Williams syndrome deletion region. *Genomics* 48, 163-170.
- Cosgaya, J.M., Aranda A., Cruces J. and Martín-Blanco E. (1998). Neuronal differentiation of PC12 cells induced by engrailed homeodomain is DNA-binding specific and independent of MAP kinases. *J. Cell Sci.* 111, 2377-2384.
- de la Puente, A., Velasco, E., Pérez Jurado, L.A., Hernández-Chico, C., van de Rijke, F., Raap, A.K. and, Cruces, J. (1998). Analysis of alphoid sequences in the pericentromeric region of human chromosome 7 by fiber-fish. *Cytogenet. Cell Genet.* 83, 176-181.
- Argente, J., Pérez Jurado, L.A. (1998). Aplicaciones de la biología molecular en endocrinología. En *Medicina Interna Básica*. (J. Guardia, J.M. Grau y A. Net, eds.), Springer-Verlag. Barcelona, pp 996-1004.
- Pérez Jurado, L.A., Coloma, A. and Cruces, J. (1999). Isolation, characterization and mapping of the human homologue gene of *rotated abdomen*, which encodes a putative Protein O-Mannosyl-Transferase. *Genomics* 58, 171-180.
- Pérez Jurado, L.A., Argente J. (1999). Aspectos genéticos de la deficiencia de hormona de crecimiento. *Rev. Esp. Pediatr.* 45, 134-145.
- de Juan, C., Iniesta, P., Cruces, J., Sánchez, A., Massa, M.J., González-Quevedo, R., Torres, A.J., Balibrea, J.L. and Benito, M. (1999). DNA amplification on chromosome 6p12 in non-small cell lung cancer detected by arbitrarily primed polymerase chain reaction". *Inter. J. Cancer*, 84:344-349.
- Pérez Jurado, L.A., Wang, Y-K., Francke, U. and Cruces, J. (1999). "TBL2, a novel transducin family member in the WBS deletion: characterization of the complete sequence, genomic structure, transcriptional variants and the mouse ortholog. *Cytogenet. Cell Genet.* 86, 277-284.

Tesinas de Licenciatura

Angela Sesto Yagüe.

Caracterización del gen humano *POMT1* y estudio de su posible implicación en distrofias musculares congénitas. Director: Jesús Cruces Pinto. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1999.

Regulación de la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial

Investigador Principal: García Vallejo, Carmen, Investigador Titular, IIB

Investigadores Asociados: Rodríguez Peña, Angeles, Investigador Titular, IIB

Personal de Apoyo Seguido de la Fuente, Ana María

Palabras Clave

Biogénesis mitocondrial, genes mitocondriales, Tfam, NRF-1 y NRF-2, mRNA, proteína, mamíferos e invertebrados

Expresión de genes mitocondriales y factores nucleares de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial

(C. G. Vallejo, A. M. Seguido y A. Rodríguez-Peña)

La función mitocondrial requiere genes codificados en dos genomas, el nuclear y el mitocondrial. Esta doble localización hace necesario que el control de la expresión sea cruzado. El único factor de transcripción mitocondrial conocido en mamíferos hasta la fecha es Tfam, codificado en el genoma nuclear. Se sabe por estudios *in vitro* que la expresión de Tfam es muy dependiente de otros dos factores de transcripción nucleares, NRF-1 y NRF-2 que, a su vez, son requeridos para la activación de otros genes mitocondriales localizados en el núcleo. Con objeto de estudiar *in vivo* la dependencia fisiológica que la expresión de los genes mitocondriales tiene de estos factores, hemos determinado en tres tejidos de rata con diferentes requerimientos energéticos, hígado, testículos y cerebro, los niveles de expresión de los genes mitocondriales en paralelo con los de los tres factores de transcripción. Los resultados indican que a) la expresión de Tfam es tres veces más baja en testículos que en hígado o cerebro, tanto a nivel de mRNA como de proteína; b) los niveles de expresión de los genes mitocondriales no son más bajos en testículos a pesar de la reducción de expresión de Tfam en este tejido, indicando que Tfam está en exceso y no limita la transcripción mitocondrial *in vivo*; c) se analizaron los niveles de mensajero de NRF-1 y NRF-2 en los tres tejidos encontrándolos más altos en testículos que en los otros dos tejidos; por tanto, los niveles bajos de Tfam no son debidos a niveles bajos de NRF-1 ó de NRF-2; d) se analizaron los niveles de proteína de las subunidades de NRF-2 encontrándose que no hay correlación entre estos niveles y los de mensajero; esta evidencia sugiere que los genes de NRF-2 presentan regulación post-transcripcional. Se han publicado resultados semejantes relativos a la regulación de otra proteína mitocondrial de origen nuclear, la subunidad β del complejo ATP sintetasa mitocondrial. Los estudios actuales se dirigen al estudio de la regulación de la expresión de estos factores en distintas situaciones fisiológicas.

Publicaciones

Santiago, J. and Vallejo, C. G. (1998). Identification of a mitochondrial RNA polymerase in the crustacean *Artemia franciscana*. Arch. Biochem. Biophys. 353, 276-284.

Escrivá, H., Rodríguez-Peña, A. and Vallejo, C. G. (1999). Expression of mitochondrial genes and of the transcription factors involved in the biogenesis of mitochondria Tfam, NRF-1 and NRF-2, in rat liver, testis and brain. Biochemie 81, 965-971.

Fisiopatología de la biogénesis mitocondrial

Investigador principal:	Garesse Alarcón, Rafael. Profesor Titular de Universidad
Investigadores asociados:	Fernández Moreno, Miguel Angel. Profesor Ayudante LRU Bornstein Sánchez, Belén. Médico especialista en Bioquímica Clínica, Hospital S. Ochoa (Leganés). Pérez Pérez, M. Luz. Profesora Titular de Universidad. F. Veterinaria UCM (Septiembre 1998-Septiembre 1999)
Personal de apoyo:	Ochoa Cao, Pilar de la Peña Ingelmo, Pablo (desde Noviembre 99)
Becarios postdoctorales	Lefai, Etienne (hasta Abril 1999) Mas Gutierrez José Antonio (desde Octubre 98) Ruiz de Mena, Inmaculada (desde Enero 1999) Petit, Nathalie (desde Septiembre 99)
Colaboraciones:	Arenas Barbero, Joaquin. Adjunto de Bioquímica clínica. Hospital 12 de Octubre (Madrid) Kaguni, Laurie S. Professor of Biochemistry. Michigan State University

Palabras Clave

mtDNA; mitocondria; *Drosophila*; enfermedades neurodegenerativas; regulación transcripcional

Biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster*

(M.A. Fernandez, E. Lefai, I. Ruiz de Mena, P. de la Peña, P. Ochoa, y R. Garesse)

La biogénesis mitocondrial es un proceso básico para la fisiología celular que requiere la expresión coordinada de dos genomas localizados en compartimentos física y genéticamente diferentes, el mitocondrial y el nuclear. Ello exige la puesta en marcha de un complejo programa de expresión génica que debe modularse en función de las necesidades energéticas de los diferentes tejidos y responder a un número variado de señales fisiológicas, incluyendo las producidas durante el desarrollo embrionario. A pesar de su importancia central a nivel celular los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis de mitocondrias animales son aún muy mal conocidos. En nuestro grupo estamos utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo con objeto de modificar *in vivo* la replicación del DNA mitocondrial y caracterizar factores de transcripción relevantes para el programa de diferenciación mitocondrial. Mediante la utilización de una combinación de técnicas *in vitro* e *in vivo* estamos caracterizando las regiones promotoras de varios genes esenciales para la biogénesis mitocondrial e identificando los factores que regulan su expresión. En colaboración con el grupo de la Dra. Kaguni (MSU) hemos demostrado que el factor de transcripción DREF, que regula la expresión de genes que participan en la replicación del genoma nuclear en *Drosophila* es también esencial para la expresión de dos genes que codifican componentes fundamentales de la maquinaria de replicación del mtDNA, la proteína de unión a DNA de cadena sencilla y la subunidad accesoria de la DNA polimerasa mitocondrial, estableciendo por primera vez un nexo de unión entre las replications de los DNAs mitocondrial y nuclear durante el ciclo celular. Por otro lado, mediante la utilización de líneas de *Drosophila* GAL4 estamos sobreexpresando diversos genes mitocondriales y versiones mutantes de los mismos con objeto de modificar la proliferación / diferenciación de las mitocondrias y generar mutantes con defectos moleculares similares a los detectados en las citopatías humanas de origen mitocondrial.

Caracterización molecular de citopatías mitocondriales

(B. Bornstein, J.A. Mas, N. Petit, M.A. Fernández-Moreno y R. Garesse)

La patología mitocondrial comprende un elevado número de enfermedades degenerativas que afectan fundamentalmente al músculo y sistema nervioso, y que en su conjunto constituyen un importante apartado de la patología humana. Aunque en su gran mayoría, las citopatías mitocondriales están causadas por mutaciones en el genoma mitocondrial que se transmiten de un modo heteroplásmico por la línea materna, la implicación del genoma nuclear ha cobrado una gran importancia en los últimos años. Nuestro grupo está colaborando con el del Dr. Joaquín Arenas (Hospital 12 de Octubre, Madrid) en la identificación de nuevas mutaciones y en el estudio molecular de las mismas. Mediante la utilización de líneas celulares híbridas que llevan distintos porcentajes de mtDNA con mutaciones específicas estamos realizando una caracterización detallada de los efectos que provocan a nivel celular. Actualmente tenemos en marcha la caracterización tanto de mutaciones del mtDNA en genes estructurales como en diversos tRNAs. Por otro lado estamos comenzando el estudio de varios casos de depleción de mtDNA, de origen nuclear, con objeto de identificar el gen o genes responsables de la enfermedad. Para ello disponemos de fibroblastos de los pacientes en los que se expresa el fenotipo y estamos estudiando la posible implicación de diferentes genes candidatos.

Publicaciones

- Enriquez, J.A., Martínez-Azorín, F., Garesse, R., López-Pérez, M.J., Pérez-Martos, A., Bornstein, B., and Montoya, J. (1998) Sistema genético mitocondrial humano. *Revista de Neurología* 26, 21-26.
- Bornstein, B., Enriquez, J.A., Montoya, J. y Garesse R. (1998) Estudios de patogenicidad y caracterización del fenotipo molecular provocado por mutaciones en el DNA mitocondrial humano. *Revista de Neurología* 26, 36-43.
- A. Talamillo, A., Chisholm, A. K., Garesse, R. and Jacobs H.T. (1998) Expression of the nuclear gene encoding mitochondrial ATP synthase α during early development of *Drosophila* and sea urchin *Mol. Biol. Rep.* 25, 87-94.
- Bornstein, B., Huertas, R., Ochoa, P., Campos, Y., Guillen, F., Garesse, R. and Arenas, J.(1998) Mitochondrial gene expression and respiratory enzyme activities in cardiac diseases. *Biochem. Biophys. Acta: Molecular Basis of Disease* (1406) 1, 85-90.
- Arenas, J., Campos, Y., Bornstein, B., Ribacoba, R., Martín, M.A., Rubio, J.C., Santorelli, F., Zeviani M., DiMauro S. and Garesse R. (1999) A double mutation (A8296G and G8363A) in the mtDNA tRNA^{lys} gene associated with MERRF. *Neurology* 52, 377-382.
- Ruiz de Mena, I., Fernández-Moreno, M.A., Bornstein, B., Kaguni L.S. and Garesse R. (1999) Structure and regulated expression of α -aminolevulinatase synthase gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 274, 37.321-37.328.

Tesis doctorales

Inmaculada Ruiz de Mena

“Regulación transcripcional de los genes que codifican la enzima d-aminolevulinato sintetasa y la proteína mitocondrial de unión a DNA de cadena sencilla”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director: Rafael Garesse. Calificación: apto cum laude.

**La troponina de *Drosophila*. Genes e Isoformas.
Hacia el establecimiento de una colonia permanente de *Drosophilas* en el espacio.**

Investigador Principal:	Marco, Roberto Catedrático de Universidad
Investigadores Asociados:	Cervera, Margarita, Profesor Titular.
Personal de Apoyo	Villa, Aida Técnico de Laboratorio, Grado III de la UAM, 1977.
Becarios Postdoctorales:	Husson, David, 2000.
Becarios Predoctorales:	Díaz, Carlos 1997. Mateos, Jesús, 1998. Herranz, Raúl desde 1999
Colaboraciones:	Medina, Javier Científico Titular, Centro de Investigaciones Biológicas. Cantón, Emilia, Investigador del Hospital La Fe, Valencia.

Palabras Clave

Drosophila, músculo, troponina, microgravedad, microondas, envejecimiento.

La troponina de *Drosophila*. Genes e Isoformas.

M. Cervera, C. Díaz, J. Mateos y R. Herranz

Durante este periodo hemos seguido caracterizando las propiedades de la Troponina de *Drosophila*, empezando a utilizar las potentes técnicas de espectrometría de masas para identificar las modificaciones posttraduccionales de los diferentes componentes. Se ha empezado a aplicar esta metodología a la troponina T y a la troponina H, ésta última es una isoforma de alto peso molecular de la tropomiosina, que se pensaba que se expresaba únicamente en el músculo indirecto de vuelo. Hemos visto que esta última se encuentra fosforilada en treoninas que hemos podido identificar dentro de la secuencia específica de estas isoformas. También hemos empezado a estudiar la troponina C, la subunidad que liga calcio y que en *Drosophila melanogaster* se encuentra codificada en al menos tres genes distintos cuyos clones ya se encuentran en nuestro laboratorio. Se están clonando en *Drosophila subobscura* y en *Drosophila virilis* y se están produciendo anticuerpos contra los distintos genes para identificar estos componentes a nivel de proteínas.

Hacia el establecimiento de una colonia de *Drosophilas* en el espacio. Puesta a punto de los experimentos y optimización de las técnicas de análisis. Aplicaciones de las microondas.

Medina, F. J., Cantón, E., Husson, D., Villa, A., Díaz, C., Mateos, J. y Herranz, R.

La iniciación de la construcción de la Estación Espacial Internacional ha traído como consecuencia una pausa en los programas de investigación en Biología Espacial, pausa que estamos aprovechando para preparar los experimentos que pensamos realizar en sus instalaciones, una vez que estén disponibles para la Comunidad Científica Internacional. Estamos desarrollando el hardware necesario para poder cultivar y preparar casi automáticamente las muestras de *Drosophila* cultivadas indefinidamente en el Espacio. Queremos identificar si la exposición a largo plazo al ambiente espacial produce cambios significativos bien en los mecanismos que controlan el desarrollo o bien en los procesos de envejecimiento, sabiendo que los sistemas biológicos más simples como son las células en cultivo son capaces de detectar y

responder a los cambios gravitacionales. Así mismo estamos tratando de optimizar ciertas técnicas cuya ejecución en el Espacio puede venir dificultada. En especial estamos estudiando los efectos estimuladores sobre la fijación de las microondas, así como optimizar la preservación de muestras fijadas y no fijadas en el Espacio. Los estudios con microondas han permitido detectar un efecto sinérgico muy importante en los efectos esporicidas y bactericidas de una serie de agentes químicos con potencial aplicación tanto en el Espacio como en la Tierra.

Publicaciones

- Benoist, P., Mas, J. A., Marco, R. and Cervera, M. (1998). Differential muscle-type expression of the *Drosophila* Troponin T gene: A 3 base-pir microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification. *J. Biol. Chem.* 273, 7538-7546.
- Domingo, A., González-Jurado, J., Maroto, M., Vinós, J., Cervera, M. and Marco, R. (1998). Troponin T is a Calcium Binding Protein in Insect Muscle: *In Vivo* Phosphorylation, Muscle Specific Isoforms and Developmental Profile in *Drosophila melanogaster*", *J. Muscle Res. and Cell Motil.* 19, 393-403.
- Marco, R. y Cervera, M. (1998). Estructura y Función del Músculo Esquelético en Reumatología. Enfermedades del Aparato Locomotor y del Tejido Conectivo (eds. E. Pascual, V. Rodríguez-Valverde, J. Carbonell y J. Gómez-Reino) Tomo I, Capítulo 4.1, pp 857-868, ELA, Madrid.
- Marco R., Díaz, C., Benguría, A., Mateos, J., Mas, J. and de Juan, E. (1999). The role of gravity in the Evolutionary Emergence of Multicellular Complexity. The Effects of Microgravity on arthropod Development and Aging *Adv. Space Res.* 23, 2075-2082.
- Medina, F. J., Lería, F., Díaz, C., Mateos, J. Mas, J. and Marco, R. (1999). Improved, non or low-refrigerated, new methods of sample preservation saving energy and stowage volume requirements in Space Station utilization scenarios" *Proc. 2d European Symposium on the Utilization of the International Space Station*, p 543-548, ESTEC, Noorwijdk.
- Marco, R., Díaz, C., Benguría, A., Mateos, J. and E. de Juan, E. (1999) *Drosophila melanogaster*, A key Arthropod Model in the study of the evolutionary Long term Adaptation of multicellular organisms to the Space Environment" *Proc. 2d European Symposium on the Utilization of the International Space Station*, p 433-440, ESA SP-433, ESTEC, Noorwijdk.
- Hernandorena, A., Scherer, K., Villa, A., Díaz, C., Mateos, J., Reitz, G. and Marco, R. (1999). a crustacean, another useful Arthropod Model system for Space Biology: *Artemia* Dormant gastrulae, A system for studying the effects of the direct exposure of complex Organisms to the Space Environment" *Proc. 2d European Symposium on the Utilization of the International Space Station*, p 521-525, ESTEC, Noorwijdk.

Tesis doctorales

- José Antonio Mas Gutiérrez El gen de la Troponina T de *Drosophila melanogaster*: Expresión diferencial y regulación transcripcional en el músculo. Universidad Autónoma de Madrid. Directores: Prof. Dra Margarita Cervera y Dr. R. Marco. Marzo 1999

Estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de la proteína α -amiloide en células de feocromocitoma (PC12) y de neuroblastoma (SH-SY5Y y N2A)

Investigador Principal:	Pascual, Angel, Investigador Científico
Investigadores Asociados:	Riesco, Garcilaso, Médico Adjunto, H. La Paz
Personal de Apoyo	Morales, Roberto (Febrero 98 - Octubre 98)
Becarios Postdoctorales:	Santiago, Jorge (Junio 99)
Becarios Predoctorales:	Villa, Ana Ruiz, Yolanda

Palabras Clave

Alzheimer. APP. Expresión génica. Regulación hormonal. Hormonas tiroideas. BDNF.

Regulación de la expresión de APP por hormonas tiroideas en células de neuroblastoma

(A.Pascual, J.Santiago, A.Villa)

La expresión de APP (amyloid precursor protein) juega un papel central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Se expresa en la mayoría de los tejidos, y su sobre-expresión se puede considerar como un factor de riesgo para la enfermedad, en tanto que induce la formación del péptido amiloide, y otros fragmentos amiloidogénicos. Diferentes agentes entre los que se encuentran los componentes de la superfamilia de receptores nucleares regulan la expresión de APP principalmente a nivel transcripcional. La triiodotironina, la forma fisiológica mas activa de las hormonas tiroideas, inhibe la actividad del promotor de APP, a través de un mecanismo que requiere la presencia del receptor de hormonas tiroideas y secuencias del promotor que contienen un elemento de respuesta a estas hormonas. La precisa caracterización del elemento de respuesta, así como la identificación de los factores que participan en la misma, constituyen el nucleo central de esta experimentación.

Regulación de la expresión de APP por receptores con actividad tirosina quinasa.

(A.Pascual, Y.Ruiz, E.Muñoz)

En cultivos celulares de origen neuronal diferentes factores de crecimiento, entre los que se encuentran el NGF (nerve growth factor) o el BDNF (brain derived neurotrophic factor), inducen la actividad del promotor de APP a través de un mecanismo que requiere la expresión de Ras, y es altamente dependiente de la concentración de suero en el medio de cultivo. Otras vías como la de la PI3 quinasa podrían estar también implicadas, en especial en la respuesta inducida por el BDNF. Por una parte, el promotor de APP contiene dos sitios AP-1, que podrían estar implicados en la respuesta inducida por estos factores de crecimiento. Por otra, secuencias del DNA localizadas en un pequeño fragmento de 15 pares de bases, que antecede al sitio de iniciación, parecen mediar una buena parte de dicha respuesta. La determinación de las vías de señalización, y de las secuencias de DNA que participan en la regulación, son los objetivos principales de esta línea de investigación.

Publicaciones

Latasa, M.J., Belandia, B., Pascual, A. (1998) Thyroid hormones regulate α -amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. *Endocrinology* 139, 2692-2698

Belandia, B., Latasa, M.J., Villa, A., Pascual, A. (1998) Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the APP gene. *J. Biol. Chem.* 273, 30366-30371

Regulación de la expresión génica en cerebro por receptores nucleares. Papel en procesos de diferenciación y apoptosis en células neuronales

Investigador Principal:	Perez Castillo, Ana María, Científico Titular
Investigador Asociado:	Santos Montes, Angel, Profesor Titular de Universidad, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac.Medicina, UAM.
Becarios Postdoctorales:	Menéndez Hurtado, Ana Isabel (1993-)
Becarios Predoctorales:	Pignatelli Moreno, Miguel (1998-) Jodra, Cristina (1998-1999) Kaninda Tshilumbu, John (1999-) Cortés Canteli, Marta (1998-) Perez-Rendón Guilló, Arturo (1999-) Sanz de los Terreros, Patricia (1999-)
Colaboraciones:	Arenas Barbero, Joaquín, Adjunto Servicio Bioquímica, Hospital 12 de Octubre. Garesse Alarcón, Rafael, Profesor Titular de Universidad, Dpto. de Bioquímica, Fac.Medicina, UAM. Lai, Cary (Assistant Professor, Department of Neuropharmacology, The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA

Palabras Clave

Apoptosis, cerebro, desarrollo, diferenciación, , expresión génica, hormona tiroidea.

Efecto del hipotiroidismo congénito sobre la expresión génica y la funcionalidad mitocondrial en cerebro de rata en desarrollo

(C.Jodra, J.Kaninda, J.Arenas, A.Santos, A.Perez Castillo)

En humanos, la deficiencia de hormona tiroidea (T3) está asociada con un profundo retraso mental y graves problemas neurológicos como sordera y descoordinación motora. También, el hipotiroidismo experimental en la rata produce un desarrollo anormal del cerebro con trastornos tales como una disminución en la conectividad interneuronal, una mielinización retrasada, defectos en la migración celular y alteraciones en los niveles de neurotransmisores. La mayoría de los efectos de T3 están mediados por receptores nucleares, que son factores de transcripción, y por tanto, los efectos observados en el cerebro son la consecuencia final de la regulación por T3 de un número limitado de genes en el núcleo. Nosotros recientemente hemos descrito que la expresión del genoma mitocondrial está regulada por T3 durante el desarrollo del cerebro. Más recientemente hemos estudiado la regulación de un conocido factor que regula la transcripción mitocondrial: Tfam, por T3, tanto in vivo durante el desarrollo del cerebro como in vitro en experimentos de transfección transitoria utilizando un fragmento de 1.2 kb de su promotor. Al estudiar los niveles de mRNA para este factor en diferentes estados tiroideos hemos observado una disminución significativa en áreas como estriado e hipocampo. Ahora estamos ampliando estos datos mediante estudios de hibridación in situ. Los estudios de transfección los hemos realizado en células de tipo neuronal TR transfectadas con diferentes construcciones del promotor humano de Tfam (1275 pb) y los receptores TRa1 y TRb1. La actividad de este promotor es inducida por T3, aumentando 5 veces sobre la actividad basal. El estudio de diferentes delecciones, junto con estudios de retardo en gel, indican que existen dos TREs funcionales en las posiciones -1241/-1212 y -1107/-1091. El promotor de Tfam responde específicamente a TRb1, y no responde a Tra1. Por esta razón, en este momento

estamos construyendo quimeras con diferentes dominios de ambos receptores para tratar de establecer el mecanismo molecular de dicha especificidad. La inducción del promotor de Tfam por T3 la hemos comprobado también en células que poseen receptores endógenos para esta hormona (adipocitos marrones, clon MB492).

Durante estos años hemos determinado más en detalle el efecto de la hormona tiroidea sobre la funcionalidad de la mitocondrias cerebrales. Para ello hemos determinado el efecto de la hormona tiroidea sobre la síntesis de ATP mitocondrial. Hemos aislado mitocondrias de distintas áreas cerebrales, y de diferentes grupos de animales (controles, hipotiroideos a hipotiroideos inyectados con T3), y determinado su capacidad de sintetizar ATP. Nuestros resultados muestran que en la corteza cerebral y estriado el hipotiroidismo reduce la velocidad de síntesis de ATP en un 52 y 59 % respectivamente en comparación con los controles, cuando se emplea como sustrato glutamato/malato. La administración de T3 a estos animales hipotiroideos recupera la actividad mitocondrial a los niveles de los controles. La cinética de recuperación es lenta, y en la corteza cerebral no se observa recuperación hasta las 48 horas después del inicio del tratamiento con T3 y esta no alcanza los niveles controles hasta las 72 horas. En el resto de las áreas cerebrales estudiadas, tálamo, mesencéfalo, cerebelo y resto (puente y bulbo raquídeo fundamentalmente) no se observa efecto de la hormona tiroidea sobre la síntesis mitocondrial de ATP. Estos datos están esencialmente de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de la actividad de los complejos respiratorios de la mitocondria, ya que la actividad de los complejos I y III esta disminuida solo en la corteza y estriado animales hipotiroideos en comparación con los controles.

Regulación de la expresión de C/EBPa y C/EBPb por receptores nucleares. Papel en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis.

(A.I.Menéndez Hurtado, M.Cortés Canteli, M.Pignatelli, P.Sanz de los Terreros, A.Santos, A.Perez Castillo).

C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) son una familia de factores de transcripción con una zona muy conservada, denominada bZIP, que incluye una cremallera de leucinas, y que están implicadas en la regulación transcripcional de genes que controlan procesos de crecimiento y diferenciación. Nosotros hemos demostrado previamente que la expresión de los genes C/EBPa y C/EBPb está regulada por T3 durante el desarrollo del hígado. Para estudiar más a fondo esta regulación hemos clonado un fragmento de 1171 pb del promotor de C/EBPa y estudiado su expresión en una línea celular inmortalizada de adipocitos marrones (MB492), que posee receptores endógenos de T3. Este fragmento está regulado por T3 en estas células (también hemos observado que los niveles endógenos de mRNA C/EBPa aumentan rápidamente después de la adición de T3 al medio de incubación). Resultados de análisis de delección, mutagénesis y retardo en gel sugieren que solo uno de los posibles TREs presentes en este fragmento representa un TRE funcional. Este TRE consiste en lo que se conoce como un palíndromo invertido (IR) separado por dos pares de bases.

Recientemente hemos observado que la expresión del gen C/EBPb no solo está regulada en hígado sino también en áreas específicas del cerebro como estriado y corteza. Paralelamente a estos estudios in vivos estamos analizando un fragmento de aproximadamente 3.0 kb del promotor de este gen y su regulación por diferentes receptores nucleares como los de hormona tiroidea (T3), ácido retinoico (RA) y proliferadores peroxisomales (PPARs). Datos preliminares indican que el fragmento de 3.0 kb responde a T3 y RA, y que la delección de 2 kb de la zona 5' anula esta regulación.

Por otro lado hemos establecido líneas estables de C/EBPb en la línea neuronal N2A con objeto de analizar su papel en diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que C/EBPb induce significativamente apoptosis sin parada de proliferación. C/EBPb induce también un estado "prediferenciado", lo cual coincide con su papel en el desarrollo de adipocitos.

Papel del factor de transcripción egr-1 en diferenciación y apoptosis de células neuronales.

(M.Pignatelli, M.Cortés Canteli, A.Perez-Rendón, A.Santos, A.Perez Castillo)

El factor de transcripción *egr-1* es un gen de respuesta temprana al que se le ha implicado en la regulación de diferentes procesos celulares. Aunque su expresión es muy abundante en cerebro, se sabe muy poco acerca de su papel en este órgano. Nosotros, utilizando oligonucleótidos antisense y líneas estables sobreexpresando *egr-1*, hemos encontrado que su expresión está asociada con la extensión de neuritas en células de neuroblastoma N2A y que esto está asociado con un aumento en la cantidad de MAP1B fosforilada, requisito temprano para la diferenciación neuronal. La sobreexpresión de este gen tiene también como consecuencia un aumento significativo de la cantidad de células N2A apoptóticas, crecidas tanto en presencia como en ausencia de suero. Actualmente estamos analizando en detalle cuales son los mecanismos responsables de esta regulación.

Papel de los proliferadores peroxisomales en el desarrollo del cáncer de mama.

(M.Pignatelli, M.Cortés Canteli, A.Santos, A.Perez Castillo)

Los receptores de los proliferadores peroxisomales (PPARs) forman parte de la gran superfamilia de receptores nucleares. Recientemente se han descubierto varios ligandos para estos receptores que incluyen derivados de las prostaglandinas y factores antidiabéticos como las tiazolidinedionas. La presencia de estos receptores se ha asociado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Hemos encontrado que la activación del PPAR γ por 15d-PGJ2 inhibe proliferación e induce acumulación de lípidos (diferenciación) y apoptosis en células de cáncer de mama MCF7. Muy interesante es el hecho de que este ligando de los PPARs es también un inhibidor muy potente de la fosforilación de los receptores tirosina kinasa ErbB2 y ErbB3 como consecuencia de la unión de dos de sus ligandos: neuregulina1 y neuregulina2. Este efecto está acompañado de un bloqueo muy eficiente de los efectos de estos ErbBs sobre proliferación, diferenciación y apoptosis en estas células. Es muy posible por tanto que la activación del PPAR γ inicia una cascada de regulación transcripcional que tiene como efecto la inhibición de los efectos de los ErbBs en estas células. En este momento estamos analizando el mecanismo responsable de esta inhibición de la fosforilación, así como de las rutas de señalización mediadoras del efecto de neuregulinas y prostaglandinas en estas células.

Publicaciones

Rodriguez-Manzanaque, J.C., A.Perez-Castillo, and A.Santos. (1998) Control by thyroid hormone of NGFI-A gene expression in lung. Regulation of NGFI-A promoter activity. *Mol.Cell.Endocrinol.* 141, 101-110.

Pignatelli, M., Cortés-Canteli, M., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (1999). Involvement of the NGFI-A gene in the differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS Letters.* 461, 37-42.

Tesis doctorales.

Ana Isabel Menéndez Hurtado "Control de la expresión de los genes *c/ebpa* y *c/ebp β* por hormona tiroidea y ácido retinoico durante el desarrollo de hígado y grasa parda. Clonaje y caracterización del promotor C/EBPa". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1998. Directora: Ana Perez Castillo. Calificación: Sobresaliente *cum laude*, por unanimidad

Regulación de la expresión génica durante la diferenciación y el desarrollo. Estudio del factor de transcripción de respuesta a suero (SRF).

Investigador Principal: Sastre Garzón, Leandro, Científico Titular
Investigadores Contratados: Escalante Hernández, Ricardo
Investigadores Asociados: Ortiz-Caro, Javier, Profesor Titular, U.N.E.D.
Becarios Predoctorales: Casero Martín, Marie-Carmen
Martínez Lamparero, Ana
Estudiantes de Licenciatura: Avila Arroyo, Sonia (Desde Octubre de 1998)
Vicente Ruiz, Juan Jesús (Desde Septiembre de 1999)

Palabras Clave

Artemia franciscana, Desarrollo, *Dictyostelium discoideum*, Evolución, Serum Response Factor (SRF), Transcripción.

Función del factor de transcripción SRF durante la diferenciación de *Dictyostelium discoideum*

(R. Escalante, J.J. Vicente, L. Sastre)

La ameba social *D. discoideum* es uno de los modelos eucarióticos de diferenciación más sencillos. Las células vegetativas se agregan en ausencia de nutrientes y diferencian para formar el cuerpo fructífero, constituido por dos tipos celulares: células de tallo y esporas. El estudio del factor de transcripción SRF ha demostrado que es un componente importante de este proceso de diferenciación puesto que las cepas en las que se ha interrumpido este gen no forman esporas maduras. Estamos estudiando en mayor detalle el papel del factor SRF durante el proceso de diferenciación y morfogénesis mediante distintos abordajes genéticos. Los datos obtenidos hasta el momento sugieren la implicación de SRF en la diferenciación de los dos tipos celulares, así como en la coordinación del proceso morfogénico.

Estudio funcional del factor SRF de *Artemia franciscana*.

(M.C. Casero, S. Avila, J. Ortiz-Caro, L. Sastre)

El aislamiento de clones que codifican para el factor SRF de *A. franciscana* ha permitido determinar que se expresa específicamente en la región ectodérmica de las nauplias de este organismo, sugiriendo su participación en la diferenciación de este tejido. Esta función sería muy diferente de la que desempeña SRF en otros organismos. Por ejemplo, en vertebrados SRF participa en la regulación del ciclo celular, en la diferenciación muscular y en la determinación mesodérmica. Estamos estudiando si la variedad de funciones que desempeña SRF en distintos organismos se deben a diferencias entre los factores de las distintas especies. Podría ser, por el contrario, que los distintos SRFs fueran funcionalmente equivalentes pero participaran en diferentes vías de señalización en cada especie. Estamos tratando de comprobar estas hipótesis estudiando la funcionalidad del SRF de *A. franciscana* en células de mamífero en cultivo.

Caracterización de los promotores de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *A. franciscana*.

(A. Martínez, J. Ortiz-Caro, L. Sastre)

El gen que codifica para la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *A. franciscana* se transcribe desde dos promotores diferentes. El promotor 1 se utiliza específicamente en las células musculares mientras que el promotor 2 es funcional en todas las células. Mientras que el promotor 1 activa modestamente la transcripción de genes testigo en células de mamífero en cultivo (5 a 20 veces de estimulación), el promotor 2 presenta una mayor actividad (hasta 125 veces de estimulación). Hemos identificado una región del promotor 2 que posee las características de una región estimuladora de la transcripción (“enhancer”). Estamos tratando de delimitar mejor esta región para intentar caracterizar los factores de transcripción que se unen a ella, regulando su actividad transcripcional.

Estudio del polimorfismo del gen que codifica para la subunidad a1 de la ATPasa de Na/K de *A. franciscana*.

(S. Avila, L. Sastre)

El aislamiento y secuenciación de varios clones, genómicos y de cDNA, que codifican para la subunidad a1 de la ATPasa de Na/K de *A. franciscana* ha desvelado la existencia de polimorfismo en este gen. Estudios mas detallados han confirmado la existencia de un grado de polimorfismo significativamente mayor en este gen que en otros genes de *A. franciscana*. La ATPasa de Na/K tiene un papel fundamental en los procesos de secreción de sal al medio ambiente que permiten la supervivencia de *Artemia* en medios de elevada salinidad. Pensamos que el polimorfismo existente en este gen podría ser un reflejo de procesos evolutivos de adaptación a medios de distinta salinidad y estamos realizando algunos estudios para comprobar o rechazar esta hipótesis.

Publicaciones

- Escalante, R. and Sastre, L. (1998) A Serum Response Factor homolog is required for spore differentiation in *Dictyostelium*. *Development*, 125, 3801-3808.
- Sastre, L. (1999) Isolation and characterization of the gene coding for *Artemia franciscana* TATA-binding protein. Expression in cryptobiotic and developing embryos. *Biochim. Biophys. Acta.* 1445, 271-282.

Departamento de Señalización Celular

Papel de la quinasa Akt/PKB en la supervivencia neuronal.

Investigador Principal:	Cuadrado Pastor, Antonio, Profesor Titular de Universidad
Personal de Apoyo	López-Valdaliso, Raquel (1998-2000) Nebot Hernández, M ^a del Carmen (2000-2001)
Becarios Predoctorales:	Martín Izquierdo, Daniel (1998) Salinas de la Rosa, Marta (1998)
Colaboraciones:	Alvarez, Alberto, Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal. Porras, Almudena, Profesor Titular, Universidad Complutense de Madrid.

Palabras Clave

Akt/PKB, apoptosis, supervivencia, transducción de señales, neurotrofinas, estrés oxidativo.

Relación funcional entre Akt/PKB y el metabolismo de la esfingomielina.

(M. Salinas, R. López-Valdaliso, D. Martín, Alvarez, A. y A. Cuadrado)

Efecto de la ceramida sobre la actividad Akt/PKB y su relación con la respuesta apoptótica bajo condiciones de estrés. Regulación de los niveles intracelulares de ceramida, esfingosina y esfingosina 1 fosfato por Akt/PKB.

Papel antiapoptótico de Akt/PKB en células nerviosas sometidas a estrés oxidativo.

(M. Salinas, D. Martín y A. Cuadrado)

Activación de Akt/PKB en respuesta a agentes oxidantes, incluyendo peróxido de hidrógeno, óxido nítrico e inductores experimentales de enfermedades neurodegenerativas. Identificación de los mecanismos responsables de la protección antiapoptótica.

Papel antiapoptótico en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

(M. Salinas y A. Cuadrado)

Estudio del posible efecto antiapoptótico de Akt/PKB en células dopaminérgicas sometidas a 1-metil-4-fenilpiridina, (MPP+). Identificación de los mecanismos responsables de la protección antiapoptótica.

Mecanismos de regulación de la localización subcelular de Akt/PKB.

(D. Martín, Alvarez, A. y A. Cuadrado)

Mecanismo de translocación de Akt/PKB al núcleo celular. Identificación de las regiones de Akt/PKB responsables de su translocación. Determinación de su estado funcional en el núcleo en cuanto fosforilación, oligomerización y asociación con otras proteínas.

Publicaciones

Murga C., Laguinge L., Wetzker R, Cuadrado A., Gutkind J.S. (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *J Biol Chem* 273, 19080-190805

Metabolismo hepático de los hidratos de carbono: Aspectos diagnósticos, fisiopatológicos y reguladores.

Investigador Principal:	Felú Albiñana, Juan Emilio. Catedrático de Universidad.
Investigadores Contratados:	Sánchez Gutiérrez, Julio César.
Investigadores Asociados:	Rossi Raviolo, Irma. Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Benloch Marín, Teresa. Pediatra Especialista de Area.
Personal de Apoyo:	García-Ripoll Catalán, Isabel (hasta Diciembre 1998)
Becarios Postdoctorales:	Del Valle Collado, Juan Carlos. (hasta Septiembre 1999) Blanco Dolado, Laura. (hasta Septiembre 1999)
Becarios Predoctorales:	Carrillo de la Fuente, Juan José Esteban Gamboa, Andrés. Salvatella Lezcano, María Parra Solís, Beatriz (desde Octubre 1998) Ibares Muñoz, Belén (desde Octubre 1998).
Colaboraciones:	Bosch Tubert, Fátima. Catedrático de Universidad. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

Palabras Clave

Metabolismo, regulación, carbohidratos, diabetes, enzimopatías, insulina.

Diagnóstico de enzimopatías relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono.

(J.E. Felú Albiñana, T. Benloch Marín, J.C. Sánchez Gutiérrez, I. García-Ripoll Catalán)

En el grupo existe una Unidad de Diagnóstico de Enzimopatías que viene funcionando como Laboratorio de Referencia para un gran número de hospitales de toda España en temas relacionados con el diagnóstico de glucogenosis, intolerancia a la fructosa y galactosemia. Entre los diagnósticos realizados en los últimos años se contabilizan más de un centenar de casos de glucogenosis (tipos I,II,III,V,VI y VII), 17 casos de intolerancia a la fructosa y 24 casos de galactosemia clásica. Desde hace tres años estamos desarrollando el Proyecto de Investigación titulado "Intolerancia hereditaria a la fructosa y galactosemia clásica. Estudio genético molecular en familias españolas", cuyo objetivo principal es realizar un estudio familiar a nivel genético-molecular de los casos de intolerancia a la fructosa y galactosemia clásica ya diagnosticados por nuestra Unidad, con objeto de identificar el tipo de defecto molecular o mutación responsable.

Mecanismos moleculares de resistencia a insulina.

(J.E. Felú Albiñana, J.J. Carrillo de la Fuente, A. Esteban Gamboa, B. Ibares Muñoz)

Esta línea de investigación, iniciada en 1987 ha permitido demostrar una serie de alteraciones en el sistema de señalización celular dependiente de glucosil-fosfatidilinositol en diferentes modelos animales de resistencia a insulina, tales como exceso de glucocorticoides, diabetes por administración de estreptozotocina, envejecimiento y obesidad genéticamente determinada (ratas Zucker obesas). Asimismo, en este último modelo de ratas obesas, hemos

estudiado los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a insulina, glucosa y sulfonilureas que presenta la gluconeogénesis hepática en estos animales. En la actualidad, estamos estudiando los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a insulina a nivel hepático en respuesta a la leptina y al TNFalfa.

Metabolismo en células gastrointestinales.

(J.E. Felú Albiñana, I. Rossi Raviolo, J.C. DelValle Collado, M. Salvatella Lezcano)

Esta línea de trabajo, desarrollada en colaboración con la Dra. Irma Rossi del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, ha permitido demostrar los cambios que acontecen en la glucólisis por la acción de diferentes secretagogos en un modelo de glándulas gástricas aisladas de conejo. En los últimos dos años, se está estudiando la influencia de las sulfonilureas, del etanol y de los AINE's sobre la funcionalidad de glándulas gástricas aisladas y células parietales de conejo en cultivo.

Desarrollo de un modelo de animal transgénico con intolerancia hereditaria a la fructosa.

(J.E. Felú Albiñana, J.C. Sánchez-Gutiérrez, B. Parra Solís, F. Bosch Tubert)

El objetivo de esta línea de investigación ha sido la obtención de un modelo animal de intolerancia hereditaria a la fructosa (IHF) mediante la sobreexpresión de fructoquinasa (FK). La hipótesis se basaba en que un aumento del desbalance entre las actividades FK y aldolasa B en el hígado favorecería el acúmulo de fructosa 1-fosfato (F-1-P) en animales transgénicos alimentados con una dieta que contenga sacarosa (intoxicación crónica), como el acúmulo de F-1-P tras la administración intraperitoneal de fructosa (intoxicación aguda). La obtención de este modelo animal está permitiendo estudiar las alteraciones metabólicas que a nivel hepático se producen por la toxicidad aguda, pero sobre todo por la toxicidad crónica, de la fructosa. Ello es de gran interés dado que no se ha descrito ningún modelo animal capaz de reproducir las anomalías metabólicas que a nivel hepático se producen por la administración crónica de fructosa en pacientes con IHF.

Publicaciones.

Del Valle, J.C., Olea, J., Pereda, C., Gutiérrez Y., Felú, J.E. y Rossi, I. (1998) Sulfonilurea effects on acid and pepsinogen secretion in isolated rabbit gastric glands. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 225-232.

Bases moleculares y celulares de la progresión maligna de carcinomas epidermoides

Investigador principal:	Quintanilla, Miguel, científico titular del CSIC
Investigador contratado:	Iglesias, Maite
Investigadores asociados:	Gamallo, Carlos, Dpto Anatomía Patológica Hospital de la Princesa, F. Medicina UAM. Cano, Amparo, Profesora titular, Dto Bioquímica, F. Medicina UAM.
Personal de apoyo:	García-Gallo, Mónica (técnico contratado)
Becarios postdoctorales:	Scholl, Francisco G. (desde Febrero 1999) Frontelo, Pilar (desde Mayo 1999)
Becarios predoctorales:	Scholl, Francisco G (hasta Febrero 1999) Frontelo, Pilar (hasta Mayo 1999) Santibáñez, Juan F. (hasta Mayo 1999) Romero, Diana (desde Noviembre 1999)
Estudiantes:	Romero, Diana (hasta Julio 1999) Pons, Mar (desde Septiembre 1999)
Colaboraciones:	Ramón y Cajal, Santiago, Dpto Anatomía Patológica, Clínica Puerta de Hierro, Madrid. Fabra, Angels, Institut de la Recerca Oncològica, Barcelona Vilaró, Senén, Universitat de Barcelona. Martínez, Jorge, INTA-Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Palabras clave: TGF- β , uPA, PA2.26, motilidad, invasividad, metástasis

TGF- β_1 y la progresión maligna. Estudio de las vías de señalización intracelular implicadas en la respuesta antiproliferativa e invasiva de queratinocitos.

(M. Iglesias, P. Frontelo, C. Gamallo, D. Romero, M. Pons, M. Quintanilla)

El factor TGF- β_1 tiene una doble función en la carcinogénesis epitelial ya que actúa como un supresor en los primeros estadios del desarrollo tumoral (en virtud de su efecto inhibitor de la proliferación celular) y como un estimulador de la malignidad en las últimas etapas de la carcinogénesis. Esta segunda función de TGF- β_1 ha podido demostrarse *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, TGF- β_1 induce una conversión epitelial-fibroblástica en queratinocitos transformados, como demostró nuestro laboratorio hace ya algunos años. Esta conversión fenotípica está asociada *in vivo* con la progresión de carcinomas bien diferenciados a carcinomas pobremente diferenciados y con un incremento de la capacidad invasiva y metastásica de los tumores. Estas observaciones, realizadas originalmente en el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, han sido confirmadas por diferentes grupos en otros tipos de carcinomas murinos y humanos. La respuesta invasiva de las células tumorales al factor, al igual que la respuesta antiproliferativa, es directa y requiere la activación de los receptores de TGF- β en la membrana plasmática. Se ha observado, además, que existe una cooperación entre oncogenes Ras y TGF- β_1 para la estimulación de la malignidad tumoral. Nuestro laboratorio ha realizado un análisis de las vías de transducción de señales implicadas en las respuestas antiproliferativa e invasiva de queratinocitos inmortalizados (no tumorigénicos) y queratinocitos transformados (que contienen un oncogén H-Ras) a TGF- β_1 . Estos estudios han puesto de relieve una interacción entre las vías moduladas por Ras-MAP quinasas y Smad en la respuesta celular a TGF- β_1 . El factor activa tanto la vía

Ras-MEK-Erk como la vía Smad, de forma rápida y transitoria, y utiliza una u otra vía para la regulación de genes específicos. Así, por ejemplo, la inducción por TGF- β_1 de p21^{Cip1}, un inhibidor de la entrada a la fase S del ciclo celular, está regulada por la vía Smad en queratinocitos normales y por la vía Ras-MAP quinasas en queratinocitos transformados. El bloqueo de la vía Smad mediante un dominante negativo de Smad4 conduce, en queratinocitos transformados por Ras pero no en queratinocitos normales, a la hiperactivación constitutiva de la vía Ras-MEK-Erk y a la progresión a carcinomas indiferenciados. Esta observación puede tener una gran relevancia clínica en tumores en los que coexisten la inactivación del gen supresor Smad 4 con mutaciones oncogénicas en Ras, como ocurre en el cáncer de páncreas y de colon.

TGF- β_1 y la progresión maligna. Implicación de uroquinasa.

(J.F. Santibáñez, P. Frontelo, M. Iglesias, J. Martínez, M. Quintanilla)

La estimulación por TGF- β_1 de la malignidad de queratinocitos transformados implica, entre otros eventos, la inducción de proteasas que degradan la matriz extracelular (ME) en el frente invasivo de los tumores. En estos dos años hemos centrado nuestro estudio en el sistema de uroquinasa (uPA), una serín-proteasa que convierte el plasminógeno inactivo en plasmina y activa diferentes prometaloproteasas que degradan un amplio rango de proteínas de la ME. uPA ha sido implicada en los procesos invasivos y metastásicos de diferentes tipos de cáncer y es un marcador de la progresión maligna en la carcinogénesis epidérmica. TGF- β_1 estimula en queratinocitos transformados la expresión / secreción de uPA (y de su inhibidor PAI-1). Mediante péptidos sintéticos que antagonizan la unión de uPA a sus receptores de la superficie celular pudimos demostrar la implicación funcional de uPA en la migración e invasividad estimulada por TGF- β_1 . Por otro lado, la utilización de inhibidores de MAP quinasas, oligonucleótidos antisentido anti-Erk y un mutante dominante negativo de Ras nos ha permitido demostrar la implicación de la vía Ras-MAP quinasas en la regulación de la expresión de uPA por TGF- β_1 . Por el contrario, la inducción de PAI-1 parece estar regulada por la vía Smad.

Caracterización del antígeno PA2.26: una nueva glicoproteína transmembrana tipo mucina implicada en la motilidad celular y en la carcinogénesis.

(F.G. Scholl, C. Gamallo, M. García-Gallo, S. Vilaró, M. Quintanilla)

Estudios previos de nuestro laboratorio habían identificado una proteína de la superficie celular, reconocida por el anticuerpo monoclonal PA2.26, que se induce en queratinocitos de la epidermis y en fibroblastos de la dermis durante la carcinogénesis y durante la cicatrización de heridas. La purificación del antígeno por cromatografía de afinidad condujo al clonaje y secuenciación del cDNA que codifica la proteína murina. Los datos de la secuencia de aminoácidos, junto con la caracterización bioquímica de la proteína, revelan que es una sialoglicoproteína transmembrana tipo mucina de bajo peso molecular. *In vivo*, se expresa en distintos tipos celulares y tejidos, fundamentalmente en cerebro (células epiteliales del plexo coroideo) y en pulmón (epitelio alveolar), aunque también está presente en el riñón (glomérulo), en los mesotelios y en células endoteliales de los vasos linfáticos. Mediante estudios de microscopía confocal y electrónica hemos demostrado que el antígeno PA2.26 se concentra en proyecciones de la membrana plasmática (microvilli, filopodios, lamellipodios y "ruffles") donde colocaliza con proteínas de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina). Las proteínas ERM actúan como interconectores del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática y están implicadas funcionalmente en la motilidad celular. Experimentos de inmunoprecipitación sugieren una interacción de PA2.26 con ezrina y radixina, pero no con moesina. La transfección del cDNA de PA2.26 en queratinocitos normales (inmortalizados), que no sintetizan el antígeno, indujo la formación de proyecciones de la superficie celular, la reorganización del citoesqueleto de actina (pérdida de la actina cortical, implicada en las uniones célula-célula mediadas por cadherinas, y de fibras de tensión, que estabilizan las uniones célula-sustrato mediadas por integrinas), la relocalización de ezrina en filopodios y "ruffles", y un aumento significativo de la capacidad migratoria de las células. Además, los transfectantes PA2.26 adquieren un fenotipo tumoral y metastásico. Estos resultados sugieren un papel funcional de PA2.26 en la motilidad

celular y en la carcinogénesis. Recientemente, hemos logrado clonar el cDNA que codifica la proteína homóloga humana, lo que nos permitirá investigar la implicación de PA2.26 en el cáncer humano.

El gen E1A de adenovirus: Una nueva aproximación a la terapia génica anticancerosa

(P. Martín-Duque, M. Quintanilla, A. Cano, S. Ramón y Cajal)

En colaboración con el grupo del Dr. S. Ramón y Cajal estamos analizando experimentalmente el potencial del gen E1A de adenovirus como un nuevo agente en la terapia anticancerosa. Los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados durante los dos últimos años demuestran que el gen E1A reduce la tumorigenicidad de líneas celulares malignas murinas y humanas, y sensibiliza a las células a la muerte celular inducida por agentes que dañan al DNA, como la radiación α y el cisplatino. Estas observaciones sugieren que el gen E1A podría utilizarse como un nuevo agente terapéutico en el cáncer.

Publicaciones

- Frontelo P, González-Garrigues M, Vilaró S, Gamallo C, Fabra A and Quintanilla M. (1998) Transforming growth factor α_1 induces squamous carcinoma cell variants with increased metastatic abilities and a disorganized cytoskeleton". *Exp. Cell Res.* 244, 420-432.
- Martín-Duque P, Alonso C, Sánchez-Prieto R, Quintanilla M and Ramón y Cajal S. (1998) Antitumoral effect of E1B defective adenoviruses in human malignant cells. *Gene Ther.* 5, 286-287.
- Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Martín P, Lleonart M, Cano A, Dotto GP and Ramón y Cajal S. (1998) In vivo antitumor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1A gene. *Cancer Gene Ther.* 5, 215-224.
- Llorens A, Rodrigo I, López-Barcons Ll, González-Garrigues M, Lozano E, Vinyals A, Quintanilla M, Cano A and Fabra A. (1998) Downregulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.* 78, 1131-1142.
- Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Lleonart M, Martín P and Ramón y Cajal S. (1998). In vivo tumor suppressor effect of retrovirus-mediated gene transfer of adenovirus E1A gene. *Adv. Exp. Med. Biol.* 451, 79-86.
- Santibáñez JF, Frontelo P, Iglesias M, Martínez J and Quintanilla M. (1999) Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor α_1 -induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 74, 61-73.
- Scholl FG, Gamallo C, Vilaró S and Quintanilla M. (1999) Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J. Cell Sci.* 112, 4601-4613.
- Martín-Duque P, Sánchez Prieto R, Romero J, Martínez A, Cebrián S, Guinea J, Domínguez C, Lleonart ME, Cano A, Quintanilla M and Ramón y Cajal S. (1999) In vivo radiosensitizing effect of the adenovirus E1A gene in murine and human malignant tumors". *Int. J. Oncol.* 15, 1163-1168.
- Martín-Duque P, Covadonga A, Sánchez-Prieto R, Lleonart M, Martínez C, González de Buitrago G, Cano A, Quintanilla M and Ramón y Cajal S. (1999) Adenovirus lacking the 19 K- and 55 K-E1B genes exerts a marked cytotoxic effect in human malignant cells. *Cancer Gene Ther.* 6, 554-563.

Quintanilla M, Frontelo P, Santibáñez JF, Illescas D, Berlanga O y Scholl FG. (1998) Carcinogénesis experimental. El modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. *Oncología*, 21, 35-40.

Quintanilla M, Frontelo P, Santibáñez JF, Scholl FG, García-Gallo M e Iglesias M. (1999) El modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. Una visión integrada del cáncer. *Rev. Cáncer (Madrid)*, 13, 41-47.

Tesis doctorales

Francisco Manuel Gómez Scholl.

"Identificación y caracterización funcional del antígeno PA2.26 asociado a la carcinogénesis química". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director: M. Quintanilla. Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad.

M. Pilar Frontelo Fernández.

"El factor TGF beta1 induce una conversión epitelial-fibroblástica en queratinocitos transformados de epidermis de ratón. Implicaciones en la progresión maligna". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director: M. Quintanilla. Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad.

Juan Francisco Santibáñez Domínguez.

"TGF beta1 induce la expresión y secreción de uroquinasa en queratinocitos transformados de piel de ratón. Implicaciones en la progresión maligna". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1999. Director: M. Quintanilla. Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad.

Ignacio García Ribas. "Desarrollo de herramientas moleculares para la terapia génica en el cáncer de ovario". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 1999. Directores: I.R. Hart (St Thomas' Hospital, Londres) y M. Quintanilla. Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad.

Vías de señalización en estrés, diferenciación y apoptosis

Investigador Principal:	Renart, Jaime, Investigador CSIC
Investigadores Asociados:	Díaz-Guerra, Margarita, Profesora Ayudante LRU
Becarios Predoctorales:	Cejas, Paloma García-Gallo, Mónica López-Maderuelo, M. Dolores
Alumnos de Licenciatura	Aguado, Silvia (curso 1998-99)
Colaboraciones:	Fernández, Margarita, IIB-AS Montiel, Carmen, Depto. de Farmacología, UAM Behrens, Margarita, Dept. of Neurology, Washington University, St. Louis, MO, EEUU
Personal de Apoyo	Moratilla, Carmen

Palabras Clave

excitotoxicidad, apoptosis, diferenciación, MAPK, receptores de glutamato, estrés del retículo endoplásmico

Estrés del Retículo Endoplásmico (RE)

(M. García-Gallo, J. Renart, M. Díaz-Guerra)

Estamos estudiando la estabilidad de la subunidad R1 del receptor de glutamato tipo NMDA en situaciones que inducen el estrés del RE, utilizando tanto neuronas corticales de rata en cultivos primarios, como un sistema heterólogo en el que las subunidades del receptor se expresan con ayuda del virus de la vacuna. Estos experimentos se han realizado utilizando compuestos activadores del estrés del RE, como tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación), ionóforos para calcio, brefeldina (bloqueante del tráfico de proteínas entre el RE y el Golgi) o tapsigargina (inhibidor de la Ca-ATPasa del RE). Nuestros resultados muestran que la subunidad R1 se degrada específicamente (en relación con otras subunidades del receptor, como la R2A) sólo con algunos de estos tratamientos mediante un mecanismo en el que participa el proteasoma.

Relación estructura/función del receptor de glutamato tipo NMDA

(M. García-Gallo, J. Renart, M. Díaz-Guerra)

Utilizando el sistema heterólogo de expresión en células no neuronales, estamos estudiando las propiedades de receptores homoméricos de las subunidades R1 o R2A en relación con los heteroméricos formados por ambas subunidades, comparables a los presentes en células neuronales. En concreto, investigamos a) estabilidad diferencial de las subunidades; b) estado de glicosilación; c) presencia o no en la membrana plasmática; d) función como canales de Ca²⁺ y e) posibilidad de que los receptores homoméricos formados por subunidades R2A induzcan muerte celular. Además, estamos generando virus de la vacuna recombinantes que produzcan las subunidades del receptor como un sistema muy eficiente de sobreexpresar estas proteínas para la determinación de su estructura.

Señalización celular durante la apoptosis y diferenciación de células N2A

(M.D. López-Maderuelo, M. Fernández, C. Moratilla, J. Renart)

Estamos estudiando el papel de las MAPK ERK y JNK en células del neuroblastoma de ratón N2A en condiciones de apoptosis (inducida por inhibición de PKC) y diferenciación. En el primer caso, la inducción de apoptosis se correlaciona con activación de JNK e inhibición de ERK. El papel de JNK en apoptosis se está estudiando mediante el uso de inhibidores y utilizando una línea celular que expresa establemente el gen protector contra apoptosis *Bcl-2*.

En diferenciación (inducida tanto por ausencia de suero, tratamiento con geldanamicina (ver más abajo) o sobreexpresión de MEKK1) observamos una activación sostenida a lo largo del tiempo de ERK y una activación de JNK, aunque la cinética de esta último depende del tipo de estímulo para la diferenciación.

Estamos también interesados en estudiar el papel jugado por la kinasa Akt en estos procesos.

Respuestas celulares a la inhibición de hsp90 con Geldanamicina (GA)

(M.D. López-Maderuelo, M. Fernández, C. Moratilla, J. Renart)

La GA es un inhibidor de la hsp90 que actúa interaccionando con el sitio del ATP. Hay numerosas proteínas implicadas en señalización que se encuentran en complejos con este complejo de chaperonas, como c-src, receptores de hormonas tiroideas o Raf-1. Cuando las células se tratan con GA, el efecto producido depende del tipo celular; así, las células N2A diferencian, mientras que las células PC12 mueren por apoptosis. Por último, los mioblastos C2C12 sufren cambios morfológicos muy acusados, con encogimiento de los cuerpos celulares. Hemos estudiado en los tres tipos celulares distintos marcadores de diferenciación o apoptosis, así como los niveles de ERK y JNK.

Estudio de la expresión génica inducida por TNF α mediante el Análisis Seriado de la Expresión Génica (SAGE)

(P. Cejas, J. Renart)

El TNF α es una citoquina con un amplio espectro de acciones, habiéndose descrito que puede inducir apoptosis y a su vez proteger de la muerte celular mediante la activación de NF- κ B. Para estudiar este comportamiento aparentemente contradictorio, estamos tratando de identificar los genes que se inducen en células N2A al ser tratadas con TNF α . mediante la técnica de SAGE, que permite un análisis global de genes tanto inducidos como reprimidos en una situación fisiológica frente a una situación control. El método consiste en aislar e identificar regiones de 10 pb (“tags”) específicos de cada gen; su mayor o menor frecuencia indican la mayor o menor abundancia del mRNA correspondiente en una u otra situación fisiológica. Este es un método de alta producción, que puede utilizarse para identificar el transcriptoma celular (conjunto de todos los genes expresados por un tipo celular en una situación definida).

Publicaciones

Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M. and Díaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (IFN)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406-414

García-Gallo, M., Behrens, M.M., Renart, J. and Díaz-Guerra, M. (1999) Expression of N-methyl-D-aspartate receptors using vaccinia virus causes excitotoxic death in human kidney cells. *J. Cell. Biochem*, 72, 135-144.

Díaz-Guerra, M., Rivas, C. and Esteban, M. (1999). Full activation of RNase L in animal cells requires binding of 2-5A within ankyrin repeats 6 to 9 of this IFN-inducible enzyme. *J. Interf. & Cytok. Res.* 19, 113-119.

Bases moleculares de la acción de la hormona tiroidea sobre la diferenciación de las células nerviosas.

Investigador Principal:	Rodríguez-Peña, M Angeles, Científico Titular
Investigadores Contratados:	Iglesias Vacas, Teresa (desde Junio 1999)
Becarios Postdoctorales:	Escrivá García, Hector (1997-1998) Handler Aragona, Ana (1998-1999)
Becarios Predoctorales:	Vega de los Reyes, Sonia Espliguero García, Gemma
Colaboraciones:	Garcia Vallejo, Carmen (IIBAS) Sarlieve, Louis L. Professor. Institut de Chimie Biologique. LNMIC-CNRS-UPR416. Strasbourg (Francia) Richardson, William. Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London (UK)

Palabras Clave

hormona tiroidea, oligodendrocito, mielinización, diferenciación, expresión de trkB.

Busqueda y caracterización de genes controlados por la hormona tiroidea (T3) en la diferenciación de células nerviosas.

(H. Escrivá, S. Vega y A. Rodríguez-Peña)

Con el fin de detectar los primeros cambios de expresión génica inducidos por T3 durante el proceso de diferenciación, se utilizó la técnica de DDRT-PCR en dos modelos celulares, la línea de neuroblastoma A431 que sobreexpresaba ectópicamente el receptor alfa de T3 (A431-TRa) y los precursores de oligodendrocitos (OLP). En ambos casos se compararon las poblaciones de ARNm procedentes de células tratadas durante 8 horas con T3 y sus correspondientes controles. Del análisis de las células de neuroblastoma, se clonaron 23 productos de PCR cuya expresión estaba aumentada o disminuida en las células tratadas con T3. El análisis de dichos clones por Northern blot redujo el número de clones positivos a 4, de los que dos de ellos no tenían homología con ninguna otra secuencia de la base de datos. De las muestras de OLP se aislaron 7 posibles clones que deben de ser confirmados.

Caracterización del gen 21, cuya expresión está disminuida en las células A431-TRa tras el tratamiento con T3.

(A. Handler, S. Vega y A. A. Rodríguez-Peña)

Uno de los genes cuya expresión cambiaba tras el tratamiento con T3 de las células A431-TRa, fue el clon 21, homólogo a un gen humano denominado gen de diferenciación inducido por ácido retinoico de función desconocida. Se estudió las características de la regulación de dicho gen por T3. Se observó que su inducción es rápida, alcanzándose un máximo a las 4 horas y está modulada por la presencia de suero en el medio de cultivo.

Análisis de los elementos reguladores de la expresión del gen trkB

(G. Espliguero y A. Rodríguez-Peña)

Nuestro grupo ha demostrado que la expresión del receptor de neurotrofinas trkB está regulada por T3 y ha caracterizado las secuencias de ADN responsables de dicho efecto. Así

mismo hemos observado que en cultivos primarios de neuronas y astrocitos, se estimula la expresión de dicho gen tras el aumento del segundo mensajero, AMPc. Se han localizado dos elementos contiguos de respuesta a AMPc (CREs) responsables de dicha activación que unen de forma específica proteínas CREB presentes en extractos nucleares de astrocitos. La mutación de uno de ellos bloquea la activación del gen en respuesta a AMPc y son totalmente funcionales en promotores heterólogos.

Efecto antiproliferativo de la expresión de las isoformas a y b del receptor de la hormona tiroidea.

(S. Vega y A. Rodríguez-Peña)

La expresión de las isoformas a y b del receptor de T3 es secuencial, es decir, mientras que la expresión de a está muy generalizada y se puede detectar desde etapas muy tempranas, la expresión de b es posterior y su localización es más restringida. Dicho patrón también se ha descrito durante el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos. Así, los OLP expresan T3Ra y durante su proceso de diferenciación se produce la coexpresión de la isoforma b. Con el fin de estudiar una posible especificidad de isoforma en los efectos de T3 se procedió a expresar cada una de ellas en la línea de fibroblastos de ratón Swiss 3T3, mediante infección con vectores retrovirales. Observamos que la expresión de los receptores disminuía la capacidad proliferativa de dichas células, siendo este efecto dramáticamente mayor cuando la isoforma expresada era la b. Este efecto parece estar mediado por un aumento en los niveles del inhibidor de ciclinas p27/Kip. Dicho aumento responde a un aumento de los niveles basales de su mensajero así como a una disminución de la velocidad de degradación de su proteína.

Publicaciones

- Pombo, P. M.G., Ibarrola, N., Alonso, M.A., Rodríguez-Peña, A. (1998). Thyroid hormone regulates the expression of the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, in neonatal rat brain. *J. Neurosc. Res.* 52, 584-590.
- Carré, J.-L., Demerens, C., Rodríguez-Peña, A., Floch, H. H., Vicendon, G., Sarlieve, L.L. (1998). Evidence that thyroid hormone receptor isoforms are sequentially expressed in oligodendrocyte lineage cells during rat cerebral development. *J. Neurosc. Res.* 54, 584-594
- Rodríguez-Peña, A., Ibarrola, N., Vega, S. (1998). Role of thyroid hormone on the oligodendrocyte type-2 astrocyte lineage. En: *Understanding Glial Cells* (Nieto-Sampedro, M., Castellano, B., Gonzalez, B., eds.). Kluwer Academic publishers. pp. 111-132.
- Pombo, P.M.G., Baretino, D., Ibarrola, N., Vega, S., Rodríguez-Peña, A. (1999). Stimulation of the myelin basic protein gene expression by 9-cis-retinoic acid and thyroid hormone: activation in the context of its native promoter. *Mol. Brain Res.* 64, 92-100
- Escrivá, H., Rodríguez-Peña, A., Vallejo, C. G. (1999). Expression of mitochondrial genes and of the transcription factors involved in the biogenesis of mitochondrial Tfam, NRF-1 and NRF-2, in rat liver, testis and brain. *Biochimie* 81, 965-971
- Baretino, D., Pombo, P. M. G., Espliguero, G., Rodríguez-Peña, A. (1999). The mouse neurotrophin receptor trkB is transcribed from two different promoters. *Biochem. Biophys. Acta* 1446, 24-34
- Rodríguez-Peña, A. (1999). Thyroid hormone and oligodendrocyte development. *J. Neurobiology*, 40, 497-512

Factores difusibles y mecanismos implicados en el control de la proliferación, diferenciación y muerte celular programada en la organogénesis y la regeneración.

Investigador Principal:	Varela Nieto, Isabel. Científico Titular
Investigadores Contratados:	León, Yolanda (1996-1999)
Personal de Apoyo	Corral, Angélica (1998) Montes, Luis Carlos (1999)
Becarios Postdoctorales:	Frago, Laura M ^a (1999)
Becarios Predoctorales:	Frago, Laura M ^a (hasta 1998) Sanz, M ^a Carmen (1993) Camarero, Guadalupe (1997) Cañón, Susana (1997) Pañeda, Covadonga (1998)
Colaboraciones:	De Pablo, Flora. Investigador Científico, CIB. De la Rosa, Enrique. Científico Titular, CIB. Avendaño, Carlos. Catedrático. UAM. . Giráldez, Fernando. Catedrático. UVA. Goñi, Félix. Catedrático, UPV. Alonso, Alicia. Catedrático, UPV Fabregat, Isabel. Profesor Titular, UCM. Arias, Javier. Médico Adjunto. H. Clínico San Carlos. Vara, Elena. Profesor Titular, UCM. Rapp, Ulf. Institut für Medizinische und Zellforschung.

Palabras Clave

Apoptosis, citoquinas, desarrollo embrionario, IGF-I, neurotrofinas, regeneración hepática.

Factores difusibles y mecanismos de transducción de señales que participan en el control de la organogénesis del oído interno: regulación de la muerte celular por apoptosis.

(I. Varela-Nieto, Y. León, MC. Sanz, LM. Frago, G. Camarero, S. Cañón)

Nuestro laboratorio está interesado en la caracterización de los factores difusibles que regulan las etapas iniciales del desarrollo embrionario del oído interno, así como en la caracterización molecular de los mecanismos de señalización que participan en la respuesta celular a estos factores. En los últimos años nos hemos centrado en el estudio de la muerte celular programada o apoptosis que contribuye de forma esencial a la morfogénesis del otocisto y a la neurogénesis del ganglio cocleovestibular. Podemos considerar tres objetivos fundamentales que son: 1) Estudio de la función del IGF-I en el desarrollo del oído interno; 2) Estudio de la acción pro-apoptótica del NGF: el desarrollo del oído interno como modelo de apoptosis inducida por factores neurotróficos; 3) Estudio de la interacción entre las vías de señalización intracelular iniciadas por el IGF-I y el NGF: mecanismos de control de la muerte celular programada.

El desarrollo del oído interno de aves es un modelo clásico de organogénesis que ofrece numerosas ventajas para el análisis en profundidad de los mecanismos implicados en la regulación de la apoptosis. Hemos descrito que el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) es un factor proliferativo y de supervivencia esencial para el desarrollo del oído interno; mientras que el factor de crecimiento nervioso (NGF) es inductor de la apoptosis.

La delección de ambas copias del gen *igf-1* en humanos está asociada con defectos congénitos en la formación del oído interno, sordera neurosensorial. Además el IGF-I induce la

regeneración de las células ciliadas del oído dañadas por tratamiento con drogas citotóxicas o por trauma acústico. En este contexto, existe un gran interés en el estudio de los mecanismos intracelulares de control de los procesos de proliferación y muerte celular que operan coordinadamente durante el desarrollo embrionario, para su posterior aplicación a la elucidación de las bases de la sordera congénita y al desarrollo de terapias encaminadas a la regeneración de las células del oído interno. Hemos comenzado la caracterización de las vías de señalización intracelular utilizadas por el IGF-I y el NGF, así como de los puntos de control en los que ambas rutas interaccionan. Entre otros parámetros hemos analizado la participación de la generación de mediadores lipídicos (IPG y ceramida), Raf quinasa y c-jun. Utilizando vectores retrovirales RCAS estamos analizando el papel del receptor p75 de NGF, de la proteína quinasa B (Akt) y de la fosforilación mediada por JNK.

Factores difusibles y mecanismos de transducción de señales implicados en el control de la regeneración hepática.

(I. Varela-Nieto, LM. Frago, C. Pañeda, A. Corral, LC. Montes)

El hígado es un órgano altamente diferenciado que mantiene la capacidad de regenerarse tras la pérdida parcial de su masa. La proliferación de células hepáticas tiene lugar en respuesta a la hepatectomía parcial, la interacción con agentes tóxicos y en la enfermedad hepática crónica. La deficiencia funcional que sucede a la pérdida de tejido hepático fuerza un aumento en la proliferación celular enfocado a la recuperación de la estructura tisular. Las citoquinas, y en especial la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) son factores fundamentales para el control del proceso de regeneración. La respuesta proliferativa se superpone al mantenimiento de las funciones metabólicas del hígado, entre las que destaca el metabolismo de la metionina. En el hígado, la metionina adenosiltransferasa (MAT) I/III es la enzima encargada de la formación de S-Adenosil Metionina (Ado Met). La Ado Met es el principal donante de grupos metilo en las reacciones de metilación y participa en la síntesis de glutatión. Diversas patologías hepáticas están asociadas con alteraciones del metabolismo de la metionina y de los procesos de metilación. El mantenimiento de los niveles de AdoMet, es por tanto de gran importancia para preservar la función hepática. En el resto de tejidos adultos y en el hígado fetal se expresa la isoenzima denominada MAT II o extrahepática. Hemos estudiado la regulación de la expresión génica de ambas MAT en un modelo *in vivo* de regeneración hepática tras hepatectomía parcial en ratas. Nuestros resultados indican que se produce un cambio en el patrón de expresión de las isoenzimas MAT, aumentándose los niveles de la forma extrahepática y disminuyendo los niveles de la forma hepática. Por lo tanto, los niveles relativos de las isoenzimas MAT son un índice del grado de diferenciación de las células hepáticas. En paralelo, hemos estudiado la regulación de las isoenzimas MAT en modelos *in vitro*, cultivo de hepatocitos y hepatoma H35. En ambos casos, combinaciones de TNF-alfa e IL-6 inducen una disminución en los niveles de la isoenzima hepática. La acción del TNF-alfa está mediada por la generación de mensajeros intracelulares lipídicos, ceramida, y no está asociada con cambios en el ciclo celular ni con la inducción de apoptosis.

Publicaciones

Jones, D.R., and Varela-Nieto, I. (1998) The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 313-326. Revisión

Frago, L.M., León, Y., De la Rosa, E.J., Gómez-Muñoz, A. and Varela-Nieto, I. (1998) Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J. Cell Sci.* 111, 549-556.

León, Y., Sanz, C., Giráldez, F. and Varela-Nieto, I. (1998) Induction of cell growth by insulin and insulin-like growth factor I is associated with Jun expression in the otic vesicle. *J. Comp. Neurol.* 398, 323-332.

Villar, A.V., Goñi, F., Alonso, A., Jones, D.R., León, Y. and Varela-Nieto, I. (1998)

Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes. FEBS letters. 432,150-154.

Frago, L.M., Giménez, A., Rodríguez, E.N. and Varela-Nieto, I. (1998) Pattern of Methionine adenosyltransferase isoenzymes expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. FEBS letters 426, 305-308.

Petitfrere, E., Sartelet, H., Vivien, D., Varela-Nieto, I., Elbtaori, H., Martiny, L. and Haye, B. (1998) Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)/inositolphosphate glycan (IPG): An intracellular signalling system involved in the control of thyroid cell proliferation. Biochimie 80, 1063-1067.

Dietrich, H., Espinosa, J.F., Chiara, J.L., Jimenez-Barbero, J., Leon, Y., Varela-Nieto, I., Mato, J.M., Cano, F.H., Foces-Foces, C. And Martín-Lomas, M. (1999) Glycosyl Inositol derivatives related to inositolphosphoglycan mediators: synthesis, structure and biological activity. Chem. Eur. J. 5, 320-336.

Sanz, C., León, Y., Troppmair, J., Rapp, U.R. and Varela-Nieto, I. (1999) Strict regulation of c-Raf kinase levels is required for early organogenesis of the vertebrate inner ear. Oncogene 18, 429-437.

León, Y., Sanz, C., Frago, L.M., Camarero, G., Cañón, S., Varela-Nieto, I and Giráldez, F. (1999) Involvement of insulin-like growth factor-I in inner ear organogenesis and regeneration. Hormone Metabolic Research 31, 126-132. Revisión.

Jones, D.R. and Varela-Nieto, I. (1999) Diabetes and the role of inositol-containing lipids in insulin signalling. Mol. Medicine 5, 505-514. Revisión.

Varela-Nieto, I. and Silos-Santiago, I. (1999) Introduction to structural and functional studies on nerve growth factor. Microscopy Res. Tech. 45, 206. Editora invitada.

Sanz, C., León, Y., Cañón, S., Alvarez, L., Giráldez, F. and Varela-Nieto, I. (1999) Pattern of expression of the Jun family of transcription factors during the early development of the inner ear: implications in apoptosis. J. Cell Sci. 112, 3967-3974.

Villar, A.V., Alonso, A., Pañeda, C., Varela-Nieto, I., Broodbeck, U., and Goñi, F.M (1999). Towards the in vitro reconstitution of caveolae. Asymmetric incorporation of glycosylphosphatidylinositol (GPI) and gangliosides into liposomal membranes. FEBS lett. 457, 71-74.

Patentes

Varela-Nieto, I., León, Y., Martín Lomas, M., Caro, H. and Rademacher, T.W. (1998) Neurotrophic properties of IPGs and IPG analogues. British patent application nº 9801899.7

Varela-Nieto, I. and Prieto J. (1998) Polyclonal and Monoclonal antibodies against IPGs. British patent applications nº 98031212, 98031213 y 98030901.

Tesis doctorales

M^a del Carmen Sanz Miguel "Funciones y mecanismo de acción del factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) durante el desarrollo temprano del oído interno". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Año 1999. Directora: Isabel Varela-Nieto. Calificación: Sobresaliente "*cum laude*".

Laura M^a Frago Fernández “Acción de las ceramidas en la supervivencia y la muerte celular. Papel en el desarrollo del oído interno”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Año 1999. Directora: Isabel Varela-Nieto. Calificación: Sobresaliente “*cum laude*”.

Seminarios Celebrados

Neus Agell Universidad de Barcelona. Barcelona	La vía de señalización de las MAPs y la calmodulina.
Vicente Andres Instituto de Biomedicina-CSIC Valencia	Control del ciclo celular en el músculo liso e implicaciones en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares
Joaquín Arribas Lab.Recerca Oncologica Hosp.Gral.Vall d'Hebron. Barcelona	Procesamiento de proteínas de superficie celular por metaloproteasas.
Joaquín Arribas Lab.Recerca Oncologica Hosp.Gral.Vall d'Hebron. Barcelona	Tráfico intracelular de proteínas mediado por proteínas PDZ
Jesús Balsinde Univ. of California. San Diego.	Fosfolipasas A2, ciclooxigenasas, transducción de señal y cáncer.
Aria Baniahmad Justus-Liebig Universität Giessen. Alemania	Alien: a novel co-repressor for nuclear hormone receptors.
Gustavo Benaim Universidad Central de Venezuela Caracas. Venezuela	Efecto del etanol y otros efectores naturales sobre la Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de células humanas.
Manuel Benito Fac. de Farmacia. Madrid	Nuevas perspectivas en las vías de señalización del IGF-I/Insulina en los adipocitos: Mecanismos de resistencia a la insulina.
Miguel A. Blázquez The Salk Institute La Jolla. California	Iniciación floral en Arabidopsis: control por hormonas.
José Borrell Instituto Cajal-CSIC Madrid	Procesamiento de la información en situaciones de disfunción del sistema inmune en la fisiopatología de la esquizofrenia.
Paola Bovolenta Instituto Cajal-CSIC Madrid	El Desarrollo del ojo de vertebrados: papel de factores de transcripción y factores difusibles.
Antonio Bru CIEMAT Madrid	Dinámica de la proliferación celular. Crecimiento tumoral
Ana Busturia Centro de Biología Molecular CSIC-UAM Madrid	Silenciamiento de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo de drosophila.

Lucinca Cacicedo Serv. Endocrinología. Hosp. Ramón y Cajal. Madrid	Mediación de factores neurotróficos y c-FOS en la activación del gen de somatostatina tras despolarización de la membrana neuronal.
Carmen Caelles Universidad de Barcelona Barcelona	Inhibición de la ruta de la JNK como mecanismo de la interferencia de los receptores hormonales nucleares sobre el factor de transcripción AP-1 (Jun/Fos).
Rui Carvalho Southwestern Medical Center University of Texas. Dallas	¹³ C isotopomer analysis as a novel approach to hepatic and cardiac metabolism.
Pedro Castañera Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC MADRID	Mecanismos de protección natural de plantas contra insectos citófagos: compuestos aleloquímicos.
Valentín Ceña Universidad de Alicante Alicante	Mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal isquémica en hipocampo de rata.
Moses Chao (*) New York University Medical Center New York	Survival and death decisions by neurotrophin receptors.
Jonathan Coles INSERM U-438 Université Joseph Fourier Grenoble. Francia	How does carbon fuel get from blood to neurons
Joan Comella Universidad de Lleida Lérida	Factores reguladores de la supervivencia y la apoptosis neuronal en la población de motoneuronas espinales.
Jaime Conde Cruzcampo. Sevilla	Arquitectura del genoma de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .
José Manuel Cuezva Dept. Bioquímica y Biología Celular Facultad Ciencias. UAM Madrid	La diferenciación de la mitocondria de hígado de rata: una decisión traduccional.
Cristina Durán C. Nac. Biología Fundamental. ISCIII Madrid	Expresión y función de la adhesión celular mediada por cadherinas en líneas de carcinoma embrionario. Obtención y estudio de diferenciación de un híbrido de fusión entre dos líneas de carcinoma embrionario.
Rosa Esteban Inst. de Microbiología Bioquímica CSIC-USA Salamanca	Replicación y mantenimiento de virus RNA en <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .

Carmen Estrada Universidad de Cádiz Cádiz	Mecanismo de acción del óxido nítrico en el control de los movimientos oculares
Isabel Fabregat Facultad de Farmacia. UCM Madrid	Transducción de señales apoptóticas inducidas por TGF-beta en hepatocitos fetales: efecto protector del EGF.
Isabel Fariñas Universidad de Valencia Valencia	Regulación de la neurogénesis y de la supervivencia neuronal por neurotrofinas.
Antonio Fernández Medarde Children's Hospital Boston	Regulación de angiogénesis por factores tumorales.
José Fernández-Piqueras Depto. de Genética. Fac. Biología. UAM Madrid	Caracterización de genes supresores de linfomas tímicos en un modelo animal.
Pedro Fernández Salguero Universidad de Extremadura Badajoz	Implicación del receptor dioxina en proliferación celular: papel del TGFβ y ácido retinóico
Hans-J. Gabius Ins. Für Physiologische Chemie Ludwig-Max. Univ. Alemania	The sugar code: the third alphabet of life.
Ernesto García Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Ayer, hoy y mañana del neumococo, un patógeno emergente.
Pedro García Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Bacteriofagos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> : su incidencia en cepas clínicas.
Jordi García-Fernández Universidad de Barcelona Barcelona	Hox, Parahox, Protohox: El genoma del anfibio en "Evo-Devo".
José Alberto García Sanz Centro Nacional de Biotecnología-CSIC Madrid	Aislamiento de mRNAs regulados traduccionalmente mediante rastreo diferencial de genotecas de cDNAs y "microarrays". Estudios en el sistema modelo de la activación de células T. Aplicaciones al diagnóstico médico de la espectroscopia <i>in vivo</i> por resonancia magnética.
Juan Manuel García-Segura Serv. Resonancia Magnética H. Ntra. Sra. del Rosario Madrid	

Fernando Giraldez Inst.. Biología y Genética Molecular UVA-CSIC Valladolid	La inducción del oído: genes, tejidos y teorías.
Rafael Giraldo Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Proteínas iniciadoras de la replicación del DNA en bacterias gram negativas y <i>S.cerevisiae</i> : caracterización estructural y funcional de dominios comunes.
Mario Gosalves Clínica Puerta de Hierro Madrid	Producción de oxígeno por mitocondrias filamentadas. Importancia para la comprensión de cáncer y neurodegeneración.
Enrique Herrero Universidad de Lleida Lérida	Expresión de ciclinas en respuesta a condiciones de estres en levadura.
Tony Hunter The Salk Institute La Jolla. California	Somatic cell cycle regulation by phosphorylation.
Benilde Jiménez Dpto. Bioquímica; Fac. Medicina. UAM Madrid	Rutas de transducción de señales implicadas en la inhibición de angiogenesis por tromboespondina.
Guillermo Jiménez Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Activación e inactivación del factor de crecimiento para fibroblastos: estudios estructurales, posibles aplicaciones terapéuticas.
Laurie S. Kaguni Michigan State University Michigan	A <i>Drosophila</i> model of mitochondrial DNA replication, mutagenesis, and disease.
Peter Klatt Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC Madrid	Regulación de factores de transcripción por s-glutathionilacion del factor de transcripción cJUN- un modelo de regulación transcripcional por el estado redox y oxido nítrico
Josef Köhrle Univ. de Würzburg Alemania	Human selenoproteins: From genes to function and regulation.
Richard Kolesnick (*) Sloan-Kettering Institute New York	Animal models of ceramide signalling
Santiago Lamas Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Regulación de la expresión de la oxido nitrico sintasa endotelial por inmunosupresores.
Ruben López Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Las enzimas líticas en neumococo: un paradigma de evolución modular de proteínas.
Miguel Manzanares Instituto Cajal-CSIC Madrid	Evolución y desarrollo, y una cabeza nueva: función de los genes Hox en cordados

M. Carmen Marín Vieira Harvard University Boston Emilio Marco Dpto. Fisiología. Fac. Medicina. UAM Madrid	p73 y p53 interacciones, similitudes y diferencias.
Enrique Martín Centro de Biología Molecular-CSIC Madrid	Inervación serotoninérgica central de las arterias cerebrales.
Alberto Martínez Serrano Centro Biología Molecular-CSIC Madrid	Especificación de tipos celulares en drosophila por MAPKs.
Isabel Mérida Centro Nacional de Biotecnología-CSIC Madrid	Terapia Génica en el sistema nervioso central mediante el uso de progenitores tumorales.
Jesús Mingorance Centro Nacional de Biotecnología-CSIC Madrid	Papel de la alfa diglicerido quinasa (α -DGK) en la regulación de la proliferación de linfocitos T.
Javier Nadal Universidad de Zaragoza Zaragoza	FtsZ y la división celular en escherichia coli.
Amelia Nieto Centro de Biología Molecular-CSIC-UAM Madrid	Apoptosis inducida por la doxorubicina: papel de las caspasas y del sistema Fas/ligando de Fas.
Flora de Pablo Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	La subunidad PA de la polimerasa del virus de la gripe, ¿es una proteasa?.
Manuel Palacín Universidad de Barcelona Barcelona	Hormonas clásicas y sus receptores en nuevas formas y funciones: el caso de la proinsulina y los receptores híbridos en el desarrollo.
Mónica Pascual Arce Baylor College of Medicine Houston, Texas	Bases moleculares de la cistinuria: más allá de rBAT.
Pilar de la Peña Dpto. Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Oviedo	Estudio de las interacciones entre el metabolismo de la glucosa y los aminoácidos mediante isótopos estables.
Pilar Pérez Ins. Microbiología Bioquímica CSIC-USA Salamanca	Componentes moleculares de la cascada de señalización iniciada en el receptor de TRH.
	Papel de la GTPasa Rho1 en la regulación del crecimiento y la morfogénesis de Schizosaccharomyces Pombe.

M ^a Teresa Pérez y J. Ramón López Inst. Biología y Genética Molecular CSIC-UVA Valladolid	Bases moleculares de la sensibilidad al oxígeno.
Dolores Perez Sala Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC Madrid	Regulación de la expresión de endotelina-1 por inhibidores de la HMG.CoA reductasa (estatinas)
Almudena Ramón-Cueto Centro de Biología Molecular-CSIC Madrid	Trasplantes de glia olfatoria promueven la recuperación funcional de ratas parapléjicas y la regeneración axonal en sus medulas espinales
Alfonsina Ramundo National Research Council (CNR) Roma, Italia	Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bilayer permeability of liposome loaded with carbonic anhydrase.
Ulf R. Rapp (*) Bayerische Julius-Maximilians-Univ. Würzburg Alemania	Cancer genes as therapeutic targets: the raf kinase family, regulators of growth, differentiation and apoptosis.
Javier Rey Campos Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	FHX, un nuevo factor de transcripción de la familia Fork Head.
Mercedes Ricote The Salk Institute San Diego	Regulación de la expresión génica en macrófagos por el receptor nuclear PPAR-gamma.
Enrique de la Rosa Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC MADRID	El embrión en crisis: Apoptosis, proteínas de estrés y otras especulaciones.
Lucas Sánchez Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC Madrid	Evolución de la determinación sexual y la compensación de dosis genica en dípteros: aspectos comparativos entre drosophila y sciara.
Cristina Santa Marta H. Gregorio Marañón y Philips Medical Systems Madrid	Imágenes RMN de activación cerebral.
Manuel Serrano Centro Nacional de Biotecnología-CSIC Madrid	Cooperación oncogénica entre el oncogen ras y la pérdida del supresor de tumores p16.
Liora Shoshani Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTA-IPN) México, D.F.	La relación entre la bomba de sodio y la adhesión celular
Claudio D. Stern (*) Columbia University New York	Interacciones celulares y moleculares que definen al organizador de Spemann.

Miguel Torres
Centro Nacional de Biotecnología-CSIC
Madrid

El análisis funcional del genoma del ratón mediante
trampas génicas.

Ignacio Torres Alemán
Instituto Cajal-CSIC
Madrid

Neurotrofismo y neuroprotección mediados por
IGF-I.

Mario Vallejo
Harvard Medical School.
Boston

Control transcripcional de la diferenciación celular
en el sistema nervioso central.

J.O. Vigoreaux
Department of Biology
University of Vermont

Functional studies of flighting, thick filament protein
of drosophila flight muscle.

W. J. Whelan
Univ. of Miami School of Medicine
Miami

Glycogenin and the biosynthesis of glycogen.

Francisco Zafra
Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM
Madrid

Estructura y función de los transportadores de
glicina en el sistema nervioso central.

(*) Seminarios organizados por el programa de
actividades del IIB con sus Unidades
Asociadas en la Universidad de Valladolid y
en la Universidad del País Vasco.

Cursos Impartidos

a) Programa de Doctorado del Departamento de Bioquímica

Curso 1998-1999

Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. I	R. Garesse J. Renart
Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. II	M. Quintanilla A. Sillero
Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. III	M. Fernández L. Sastre
RMN en Biología y Medicina	S. Cerdán
Cáncer: Oncogenes y Genes Supresores	A. Muñoz
Aplicaciones de HPLC a la biomedicina	P. Llorente

Curso 1999-2000

Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. I	J. J. Aragón A. Coloma
Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. II	C. Fernández-Heredia R. Marco
Bases Bioquímicas y Celulares de la Función Celular. III	A. Cano J. E. Felú
RMN en Biología y Medicina	S. Cerdán

b) Otros

Curso de Operadores de Instalaciones Radiactivas (1998)	María Teresa Macías Leandro Sastre
Secuenciación automática de muestras biológicas (1998) (Plan de Formación Interna, CSIC)	Gemma Rodríguez-Tarduchy
VI Simposio sobre Oncogenes. Fundación Ramón Areces y Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer	Juan Carlos Lacal
International Symposium on Virus and Cancer. Sociedad Española de Virología, FESEO y Centro de Estudios Sociológicos Aplicados. Hospital Ramón y Cajal	Juan Carlos Lacal
Jornadas sobre “El Cáncer: Biología y Agentes Anticancerosos”	Juan Carlos Lacal

Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer y
Sociedad Española de Química Terapéutica.
Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

Método científico (1999)
Facultad de Biología Universidad de La Habana. Cuba

Carlos Gancedo

I Simposio Oído Interno (1999)

Isabel Varela
Fernando Giráldez

Introducción a la Biología Molecular (1999)
(Plan de Formación Interna, CSIC)

Gemma Rodríguez-Tarduchy

Primer Encuentro de Investigadores Latinoamericanos
sobre el Cáncer. Instituto de Investigación y Ciencia de Puerto
del Rosario, Asociación Española de Investigación sobre el
Cáncer y Asociación Canaria de Oncología Médica. Fuerteventura

Juan Carlos Lacal

Specificity in Ras and Rho-mediated signalling events.
Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones.

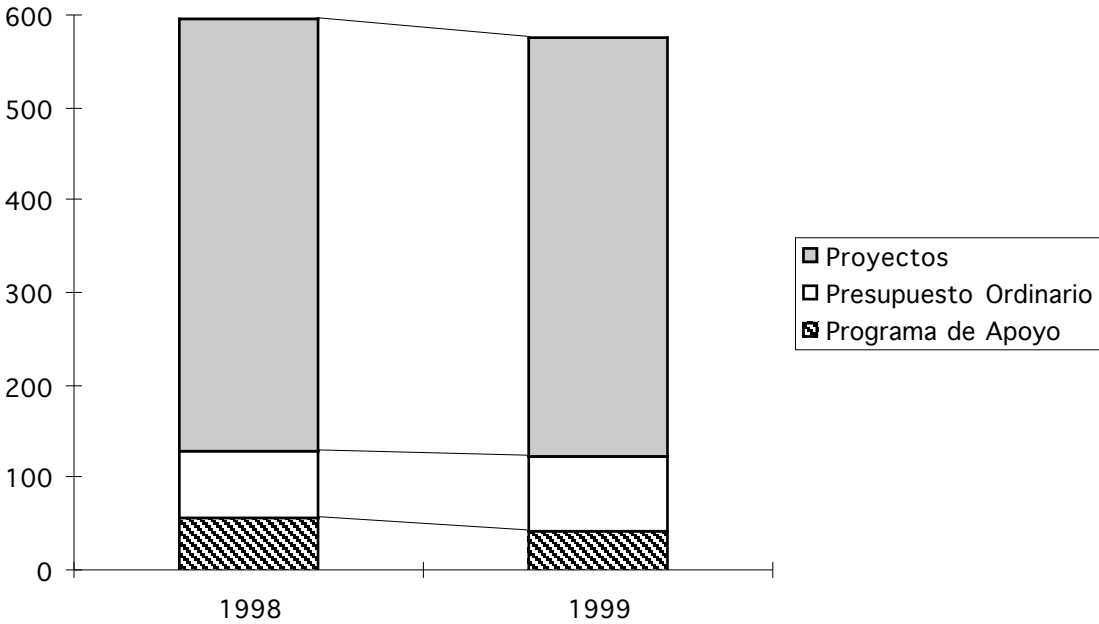
Juan Carlos Lacal
H. Bos and A. Hall

Métodos de estudio del sistema nervioso
Universidad Complutense de Madrid

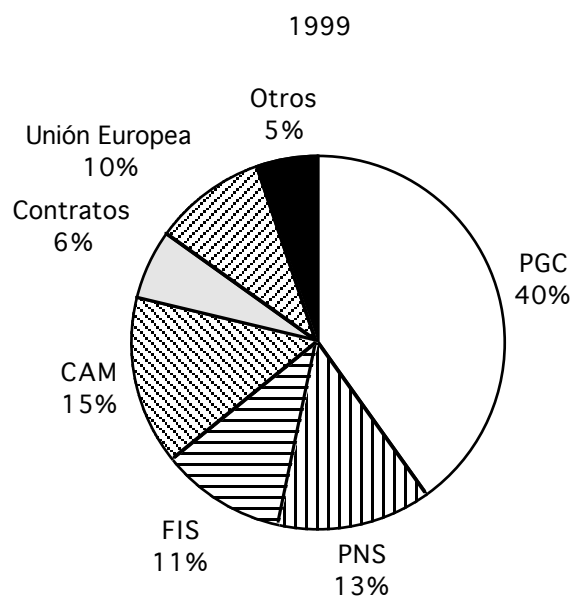
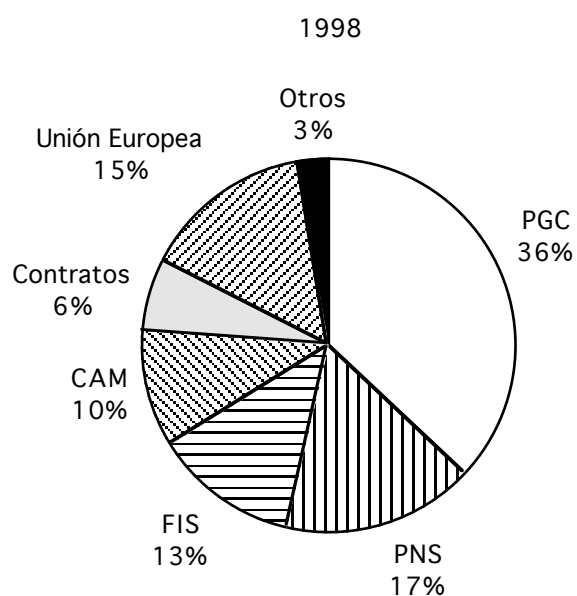
S. Cerdán
J. Monreal

Resumen Económico

INGRESOS
(MILLONES DE PESETAS)



DISTRIBUCION DE LOS PROYECTOS SEGUN LA ENTIDAD FINANCIADORA



Índice de Jefes de Laboratorio

Alemany, Susana, 101
 Aragón, Juan J., 89
 Aranda, Ana, 121
 Bernal Carrasco, Juan, 55, 67, 91
 Calés Bourdet, Carmela, 103
 Cano, Amparo, 15, 151
 Cerdán García-Esteller, Sebastián, 105
 Cervera Jover, Margarita, 125, 135
 Coloma Jerez, Antonio, 55, 91, 127
 Crespo Baraja, Piero, 59
 Cruces Pinto, Jesús, 91, 127
 Cuadrado Pastor, Antonio, 147
 Eraso, Pilar, 41, 47
 Escobar del Rey, Francisco, 61, 73
 Felú Albiñana, Juan Emilio, 149
 Fernández Martín Margarita, 109, 155
 Gancedo, Carlos, 43
 García Vallejo, Carmen, 131, 159
 Garesse Alarcón, Rafael, 133, 139
 González Castaño, José, 111
 Günther, María Antonia, 97
 Lacal Sanjuán, Juan Carlos, 21, 25
 Lagunas, Rosario, 45
 Llorente, Pilar, 95
 Marco, Roberto, 135
 Martín Pérez, Jorge, 113
 Mazón, M^a Jesús, 41, 47
 Morreale de Escobar, Gabriela, 61, 73
 Muñoz Terol, Alberto, 55, 67
 Obregón, M^a Jesús, 61, 73
 Pajares Tarancón, M. de los Angeles, 115
 Pascual, Angel, 137
 Perez Castillo, Ana María, 139
 Perona Abellón, Rosario, 21, 25
 Pestaña, Ángel, 29
 Portillo, Francisco, 15, 49
 Quintanilla, Miguel, 15, 151
 Renart, Jaime, 109, 155
 Rodríguez Peña, Angeles, 131
 Sagarra Conde, Rosa de, 111
 Santisteban, Pilar, 77
 Sastre Garzón, Leandro, 143
 Sempere, Juana María, 51
 Sillero, Antonio, 97
 Vallejo, Mario, 83
 Vara, Francisco, 117
 Varela Nieto, Isabel, 161
 Villalobo, Antonio, 33

Índice de Personas

Abajo, Ricardo de, 55
 Abelairas, José, 29
 Aguado, Silvia, 155
 Aguilera Peralta, Abelardo, 117
 Ajenjo Garcia, Nuria, 59
 Akli, Hocine, 97
 Alguacil, Rafael, 11
 Alonso, Alicia, 161
 Alonso, Javier, 29
 Alvarez García, Luis, 115
 Álvarez Pérez, José, 105
 Alvarez, Alberto, 147
 Alvarez, Laura, 73
 Alvarez, Manuel, 67
 Antón Santos, Juan Miguel, 33
 Aran ,Vicente, 95
 Arenas Barbero, Joaquin, 133, 139
 Ares, Susana, 61
 Argomaniz, Luisa, 95
 Arias, Javier, 161
 Arozarena Martinicorena, Imanol, 59
 Arredondo Lamas, Juan José, 125
 Arregui, M. Rosa, 12
 Arufe Gonda, María del Carmen, 61
 Atencia, Eva Ana, 97
 Avendaño, Carlos, 161
 Avila Arroyo, Sonia, 143
 Avila, Jesús, 89
 Aznar Benitah, Salvador, 21

Bajo, M^a Auxiliadora, 117
 Ballester Jareño, Alicia, 103
 Ballesteros García, Paloma, 105
 Baniahmad, Aria, 67
 Barnácer, M., 29
 Barnault, Elodie, 97
 Barón, Gabriel, 12
 Barroso, Isabel, 77
 Behrens, Margarita, 155
 Bello, María José, 29
 Benaim, Gustavo, 33
 Benlloch Marín, Teresa, 149
 Berbel, Pere, 61
 Bermúdez de Castro, Maria Isabel, 43
 Bernstein, Sandford, 125

Blanco Chapinal, Soledad, 113
 Blanco Dolado, Laura, 149
 Bonilla, Félix, 67
 Bornstein Sánchez, Belén, 133
 Bornstein Sánchez, Rafael, 103
 Bosch Tubert, Fátima, 149
 Bouck, Noel, 67
 Braga, Vania M. M., 15
 Bustelo, Xose, 59

Caballero Borda, Amelia, 91
 Caelles, Carme, 67
 Calvo, Rosa Maria, 73
 Calvo, Víctor, 101
 Camarero, Guadalupe, 161
 Candel Alvarez, Elena, 91
 Cantón, Emilia, 135
 Cañón, Estela, 121
 Cañón, Susana, 161
 Cárcamo Valor, Cristina, 117
 Carrascosa, Jose María, 111
 Carrillo de la Fuente, Juan José, 149
 Casero Martín, Marie-Carmen, 143
 Castro Notario, María Angeles, 117
 Cato, Andrew, 77
 Cebolla, Beatriz, 83
 Cejas, Paloma, 155
 Chacón Gallardo, Gloria, 55
 Chen, Li-Chun, 83
 Coles, Jonathan, 105
 Corral, Angélica, 161
 Cortés Canteli, Marta, 139
 Cortés Ruiz, Arancha, 127
 Cruz Fernandez-Castañeda, Fátima, 105
 Cuadrado, Ana, 67
 Cuenca, Silvia, 12
 Cuesta, Isabel, 77

DeLecea, Luis, 55
 Díaz Triviño Sara, 25
 Díaz, Carlos, 135
 Díaz-Guerra, Margarita, 155
 Diego, Ana Isabel de, 97
 Dilla, Tatiana, 77
 Dölle, Andreas, 105
 Dominguez Cáceres, María Aurora, 113

Dominguez, Carmen, 109
 Duportets, Line, 47
 Durán Ruiz, Socorro, 61

 Embade Urrutia, Nieves, 21
 Escalante Hernández, Ricardo, 89, 109, 143
 Escámez Toledano, María José, 55
 Escobar-Morreale, Hector, 61
 Escribano, Victoria, 47
 Escrivá García, Hector, 159
 Espada, Jesús, 15
 Espinosa Ubeda, Antonio, 21
 Espliguero García, Gemma, 159
 Esteban Gamboa, Andrés, 149
 Estrada, Carmen, 33

 Fabra, Angels, 15, 151
 Fabregat, Isabel, 161
 Fagard, Remi, 113
 Falcón, Juan Manuel, 41
 Felipe, Javier de, 55
 Fernández, Antonio, 12
 Fernández Braña, Miguel, 21
 Fernández de Heredia, Claudio, 93
 Fernández Martínez, Félix, 21
 Fernández- Mayoralas, A., 89
 Fernández Moreno, Miguel Angel, 133
 Fernández Ruiz, Mario, 33
 Fernández Valerón, Pilar, 21
 Figueroa, Angélica, 67
 Flores Mauriz, Carmen-Lisset, 43
 Frago, Laura M^a, 161
 Frampton, Jonathan, 103
 Fresno Vara, Juan Ángel, 113
 Frontelo, Pilar, 151
 Fuente, Natalia de la, 49

 Gabius, Hans-J., 33
 Gallardo, Manuel, 11
 Gallego Gómez, Juan Carlos, 21
 Gamallo, Carlos, 15, 101, 151
 Gándara, María Luisa, 101
 García, Angel, 12
 García de Herreros, 67
 García Espinosa, María Antonia, 105
 García Martín, María Luisa, 105

 García Pérez, Ana, 105
 García Rodríguez, Paloma, 103
 García Silva, Susana, 121
 García, Bibian, 77
 García, Héctor, 67
 García, Luis Francisco, 67
 García, Teresa, 97
 García-Gallo, Mónica, 151, 155
 García-Miguel, Purificación, 29
 García-Nieto Hernaiz, Rosa M^a, 33
 García-Olmo, Damián, 83
 García-Ripoll Catalán, Isabel, 149
 Garrido, Mariano, 11
 Garrido Pérez, Francisco, 115
 Gasset, María, 115
 Gillies, Robert J., 105
 Giráldez, Fernando, 161
 Glinski, Mirko, 83
 Gómez García Lourdes, 25
 González, José Manuel, 67
 González, Margarita, 67
 González, M^a Victoria, 67
 González-Mariscal, Lorenza, 15
 Goñi, Félix, 161
 Grau , Rosa, 95
 Gregorio, Rosa de, 101
 Guadaño-Ferraz, Ana, 55
 Guerra Gómez, Javier, 25
 Gutiérrez, , Ana, 12
 Gutkind, Silvio, 59

 Handler Aragona, Ana, 159
 Heide, Daan van der, 61, 73
 Heinisch, Jürgen J., 89
 Heinrich, Olaf, 125
 Herigault, Gwenaël, 105
 Hermida, Carmen, 89
 Hernández Alcoceba, Rubén, 21
 Hernández Hernando, Silvia, 33
 Hernández, Arturo, 73
 Hernando, Raquel, 101
 Herranz, Raúl, 135
 Herrero, Pilar, 43
 Hongbing Li, 33
 Husson, David, 135

Ibares Muñoz, Belén, 149
 Iglesias Vacas, Teresa, 159
 Iglesias, Maite, 151
 Isabel Castillo, Ana, 121

Jauniaux, Eric, 61
 Jiménez Martínez, Amparo, 33
 Jiménez, Benilde, 67
 Jimenez-Lara, Ana M., 121
 Jodra, Cristina, 139

Kaguni, Laurie S, 133
 Kaninda Tshilumbu, John, 139
 Keyse, Stephen, 25
 Knecht, Erwin, 111

Lafarga Coscujuela, Miguel, 59
 Lafarga, Miguel, 67
 Lafuente Monasterio, 43
 Lai, Cary, 139
 Langa, M. Paz, 11
 Lavado Autric, Rosalía, 61
 Lauro, Roberto di, 77
 Lea, Cecilia, 43
 Lefai, Etienne, 133
 León Serrano, Javier, 59
 León, Yolanda, 161
 Leoz Abellanas, Gonzalo, 33
 Llorens, Sergio, 105
 López, Roberto, 12
 López Collazo, Eduardo, 21
 López-Maderuelo, M. Dolores, 155
 Lopez-Otin, Carlos, 59
 López-Valdaliso, Raquel, 147
 López-Vara, M^a Carmen, 115
 Lorenzo Ovejero, Petra Isabel, 55
 Losada, Alejandro, 77
 Lucas Parras, Luisa, 21
 Lucero, Pilar, 45
 Luengo, Gemma, 12
 Lugo, Miguel, 33
 Luis Jiménez, Oscar de, 127

Macías, M. Teresa, 12
 Madrid Pérez, Olga, 25, 97
 Manzano Moltó, Jimena, 55

Marco Ferreres, Raquel, 125
 Marsa, Miguel, 12
 Martín Izquierdo, Daniel, 147
 Martín Sánchez-Cantalejo, Yolanda, 21
 Martín, Eva, 73
 Martín, Francisco, 41
 Martínez de Arrieta Martínez, Cruz, 91
 Martínez de la Mata, Jorge, 121
 Martínez de Mena, Raquel, 73
 Martínez de Narvaja, Eva, 33
 Martínez Gomariz, Monstserrat, 25
 Martinez Lamparero, Ana, 143
 Martinez Muñoz, Raúl, 113
 Martínez Piñeiro, Luis, 25
 Martínez, Jorge, 151
 Martínez, M^a Teresa, 67
 Martínez-Burgos, Mónica, 47
 Martínez-Costa, Oscar, 89
 Mas Gutierrez José Antonio, 125, 133
 Matallanas Gonzalez, David, 59
 Mateos, David, 47
 Mateos, Jesús, 135
 Mayo Melchor, Isabel, 111
 Mayor, Federico, 111
 Medina, Begoña, 11
 Medina, Diego L., 77
 Medina, Gema, 73
 Medina, Javier, 135
 Mena, M^a Ángeles, 33
 Méndez Pertuz, Marinela, 121
 Mendiola, Marta, 29
 Menéndez Hurtado, Ana Isabel, 139
 Merino, Javier, 12
 Mingot, Manuela, 11
 Mirasierra, Mercedes, 83
 Molano, Jesús, 41, 47, 125
 Molina Sánchez, Susana, 117
 Montaner Salas, Silvia, 21
 Montes, Amalia, 15
 Montes, Luis Carlos, 161
 Monteserín, Rosa, 11
 Montiel, Carmen, 155
 Morales Arcia, Francisco, 105
 Morales, Roberto, 137
 Moratilla, Carmen, 155
 Moreno, M. Carmen, 11

Moreno Bueno, Gema, 109
 Moreno, Eulalia, 45
 Morgado, Eulalia, 47
 Morte Molina, Beatriz, 55

Navares, Ramón, 12
 Navarro Palanca, M^a Asunción, 93
 Navarro, Cristina, 67
 Nebot Hernández, M^a del Carmen, 147
 Nebreda, Paloma, 29
 Nevado, Julian, 121
 Nieto, Angela, 15
 Nuñez, Fernando, 12

O'Brian, Catherine A., 33
 Obregón Calderón, Patricia, 21
 Ochoa Cao, Pilar, 133
 Oliva Mayor, Joaquín, 111
 Olmeda, David, 15
 Ortega Pérez, Inmaculada, 33
 Ortiz, Lourdes, 77
 Ortiz-Caro, Javier, 143
 Osorio, Hugo A. Carvalho Pinheiro, 97

Pablo, Flora de, 161
 Palacios, Daniela, 121
 Palacios, José, 15, 101
 Palomo Jiménez, Paloma I, 33
 Pañeda, Covadonga, 161
 Parra Solís, Beatriz, 149
 Pascual Garvi, José María, 105
 Peinado, Héctor, 15
 Penalva Ambrona, Verónica, 21
 Peña Ingelmo, Pablo de la, 133
 Peñalver, Élide, 45
 Pérez, Javier, 12
 Pérez Capilla, Tatiana, 103
 Pérez de Miguelsanz, Juliana, 115
 Pérez Jurado, Luis, 127
 Perez Marquez, Julio, 55
 Pérez Pérez, M. Luz, 133
 Pérez, Joaquin, 101
 Pérez, Mirna Alicia, 15
 Pérez-Juste, Germán, 121
 Perez-Rendón Guilló, Arturo, 139
 Pérez-Villamil, Beatriz, 83

Pestaña, Marcia, 29
 Petit, Nathalie, 133
 Petit, Thomas, 43
 Pignatelli Moreno, Miguel, 139
 Pina, Raquel, 12
 Pons, Mar, 151
 Porras, Almudena, 147
 Presas Castilla, M^a Jesús, 61
 Prudencio Seseña, M^a Concepción, 33

Ramírez de Molina, Ana, 21
 Ramón y Cajal, Santiago, 15, 151
 Ramos García, M. Angeles, 21
 Rapp, Ulf, 161
 Rausell, Estrella, 55
 Regidor, Natalia, 73
 Remy, Chantal, 105
 Renau, Jaime, 67
 Rey, Juan Antonio, 29
 Richardson, William, 159
 Riesco, Garcilaso, 137
 Rincón, Sonia del, 21
 Rivas, Marcos, 77
 Roda Frade, José María, 105
 Rodrigo, Isabel, 15
 Rodríguez, Jesús, 11
 Rodríguez Arrondo, José Luis, 115
 Rodríguez González, Agustín, 21
 Rodríguez Iglesias, Cristina, 43
 Rodríguez Marcos, Miguel Angel, 113
 Rodríguez Vargas, Carmen, 33
 Rodríguez-Barbi, 12
 Rodríguez-Peña, M Angeles, 159
 Rodríguez-Tarduchy, 12
 Rodríguez-Viciano, Pablo, 15
 Rodríguez-Vilariño, Susana, 111
 Romero, Diana, 151
 Rosa, Juana de la, 12
 Rosa, Enrique de la, 161
 Rossi Raviolo, Irma, 149
 Ruano Ramos, M^a José, 33
 Ruiz de Mena, Inmaculada, 133
 Ruiz, Yolanda, 137
 Ruiz-Peinado, 11, 12

Sáinz, Aránzazu, 83

Salas, Valentina, 33
 Salinas de la Rosa, Marta, 147
 Salvatella Lezcano, María, 149
 Sánchez Gutiérrez, Julio César, 149
 Sánchez Pérez Isabel, 25
 Sanchez, Cristina, 89
 Sánchez, Valentina, 89
 Sánchez-Góngora, Estrella, 115
 Sanchez-Pacheco, Aurora, 121
 Sandoval , Ignacio, 47
 Saniger Bernal, Luisa, 21, 25
 Santamaría, M^a Belén, 89
 Santiago, Concepción, 12
 Santiago, Jorge, 137
 Santibáñez, Juan F., 151
 Santos Montes, Angel, 139
 Sanz Aparicio, Juliana, 115
 Sanz de los Terreros, Patricia, 139
 Sanz Moreno, Victoria, 59
 Sanz, M^a Carmen, 161
 Sarasa, José Luis, 29
 Sarlieve, Louis L., 159
 Scholl, Francisco G., 151
 Schröder-van der Elst, Janny, 73
 Schwartz, Petra, 83
 Seguido de la Fuente, Ana María, 131
 Seipelt, Crista, 105
 Seisdedos, Maria Teresa, 77
 Selgas, Rafael, 117
 Señor, Pablo, 12
 Sesto Yagüe, Angela, 127
 Silles Eduardo, 47
 Silva, Augusto, 113
 Soriano, Eduardo, 67
 StGermain, Donald L., 55
 Stürtz, Laszlo, 105
 Sutcliffe, J. G, 55
 Tenbaum, Stephan, 67
 Tobar, Juan A, 77
 Tolón, Rosa, 121
 Tovar, Juan, 61
 Uña, Ricardo, 12
 Urade, Yoshihiro, 67
 Valero Quirós, Carmen, 127
 Valle Collado, Juan Carlos del , 149
 Valero, Isabel, 101
 Vallejo, Inmaculada, 83
 Vaquero, J, 29
 Vara, Elena, 161
 Vara, Rafael, 12
 Varea Román, Silvia, 25
 Vargiu, Pierfrancesco, 55
 Vega de los Reyes, Sonia, 159
 Vega, Susana, 41
 Velasco, Ana, 101
 Velasco, Juan Angel, 77
 Vennström, Bjorn, 55
 Vera ,Pilar, 95
 Vicente Ruiz, Juan Jesús, 143
 Vilaró, Senén, 151
 Villa, Aida, 135
 Villa, Ana, 137
 Zaragoza, Oscar, 51
 Zenke, Martin, 67
 Ziegler, Ann, 105

Índice de Palabras Clave

activación por glucosa, 49
 adipocitos marrones, 73
 Akt/PKB, 147
 Alzheimer, 137
 análisis fenotípico, 47
 antifolatos, 95
 antitumorales, 21
 apoptosis, 21, 25, 139, 147, 155, 161
 APP, 137
Artemia franciscana., 143
 astrocitos, 83

 BDNF, 137
 betaina:homocisteína metiltransferasa, 115

 cadherina E, 15
 calmodulina/fosfo(Tyr)calmodulina, 33
 cAMP, 51, 83
 cáncer, 67, 77, 105
 próstata, 25
 CAPD, 117
 carbohidratos, 93, 149
 cartografiado cromosómico, 91
 β -catenina, 15
 células, 113
 hipofisarias, 121
 mesoteliales, 117
 tumorales, 89, 113
 cerebro, 55, 61, 67, 139
 CFTR, 41
 chaperona, 47
 ciclo celular, 77, 103
 cienciométrica, 29
 cisplatino, 25
 citoquinas, 161
 CL100, 25
 clonación, 91, 109
 ClpP, 111
 COT/Tpl-2, 101

 deleciones, 29
 desarrollo, 139, 143
 embrionario, 161
 desyodasas, 55, 73
 diabetes, 149

Dictyostelium discoideum., 89, 109, 143
 diferenciación, 77, 139, 155, 159
 neural, 83, 121
 dinucleósido polifosfatos, 97
 distribución intracelular de proteínas, 47
 distrofias musculares congénitas, 127
Drosophila, 125, 133, 135

 ecto 5'-fosfodiesterasas/nucleótido-
 pirofosfatasas, 33
 efluentes peritoneales, 117
 embarazo, 61
 endocitosis, 45
 enfermedades hereditarias, 127
 neurodegenerativas, 133
 envejecimiento, 135
 enzimopatías, 149
 Eph, 101
 erbA, 67
 esclerosis lateral amiotrófica, 127
 estrés del retículo endoplásmico, 155
 oxidativo, 147
 estructura, 115
 estructura-función, 41, 47, 49
 evolución, 143
 Ewing, 29
 excitotoxicidad, 155
 expresión de trkB, 159
 expresión génica, 77, 137, 139
 múltiple, 29

 factores de crecimiento, 117, 121
 de Intercambio, 59
 de transcripción, 21
 feto, 61
 fosfodiesterasas, 93
 fosfofructokinasa, 89
 fosforilación, 47
 FPGS, 95
 fructosa-1,6-bisfosfatasa, 51

 genes mitocondriales, 131
 musculares, 125
 genética Humana, 127
 glia, 105

glicolisis, 43
 glutation, S-adenosilmetionina, 115

 H⁺-ATPasa, 49
 hexokinasa, 43
 homeodominios, 83
 hormonas tiroideas, 55, 67, 137, 139, 159
 H-ras, 15

 IGF-I, 161
 inactivación catabólica, 45
 de transportadores, 45
 inhibidores, 95
 insulina, 149
 interrupción génica, 47
 invasión tumoral, 15
 invasividad, 151
 invertebrados, 131

 JNK, 25

 lactasa intestinal, 89
 lectinas, 33
 levadura, 43, 51
 líneas celulares humanas (PANC-1, HT-29 y MCF-7), 95
 linfocitos, 101
 LLA murina (L5178 Y), 95
 luciferasa, 97

 mamíferos, 131
 MAP kinasas, 59, 155
 megacariocitopoyesis, 103
 metabolismo, 149
 modelos matemáticos, 97
 metástasis, 151
 metionina adenosiltransferasa, 115
 microgravedad, 135
 microondas, 135
 DNA, 133
 biogénesis, 131
 mielinización, 159
 mitocondria, 133
 Mkkk, 101
 motilidad, 151
 MRI, 105

 mRNA, 131
 MRS, 105
 músculo, 125, 135
 mutaciones, 29
 mutagenesis dirigida, 49

 neonato, 61
 neurogranina, 55
 neurona, 105
 neurotrofinas, 121, 147, 161
 NRF-1, 131
 NRF-2, 131
 núcleo estriado, 55
 nucleótidos ciclicos, 93

 oligodendrocito, 159
 oncogenes, 21, 101
 óxido nítrico, 33

 p38, 59
 PA2.26, 151
 patología molecular, 91
 peritonitis, 117
 piruvato carboxilasa, 43
 plegamiento, 115
 prematuros, 61
 procesamiento, 111
 prolactina, 113
 proliferación y diferenciación celular, 113
 proteasoma, 111
 protein kinasa, 109, 111
 activadas por mitógenos, 33
 proteína, 131
 proteínas G, 59
 protein-O-manosiltransferasas, 127
 proteolisis, 111
 PSA, 25

 Ras, 55, 59
 GTPasas, 21
 recambio de proteínas de membrana, 45
 receptor del factor de crecimiento epidérmico, 33
 de citoquinas, 113
 de glutamato, 155
 nucleares, 67, 121

redes neuronales, 105
regeneración hepática, 161
regulación, 149
 génica, 67, 83
 hormonal, 137
 transcripcional, 121, 133
relación estructura/función, 89
replicación del DNA, 103
represión catabólica, 51
resistencia a drogas, 25
 celular, 95
retinoblastoma, 29

Saccharomyces cerevisiae, 41, 45, 93
secuenciación, 91
Serum Response Factor (SRF), 143
síndrome de Williams, 127
Snail, 15
somatostatina, 83
supervivencia, 147

T3, 73
T4 DNA ligasa, 97
T4 RNA ligasa, 97

Tfam, 131
TGF- β , 151
tirosinas quinasas (Src, Jak), 113
tiro
xina, 61, 73
transcripción, 77, 125, 143
transducción de señales, 59, 77, 147
transformantes, 109
transmisión de señales, 21
transportadores ABC, 41
Triac, 73
triyodotironina, 61
troponina, 135
tubulina, 89
tumores neurales, 29

UCP, 73
uPA, 151

vEGF, 117

YCF1, 41
yodo, 61

Summaries

1. Department of Molecular and Cellular Biology of Cancer

Regulation of E-cadherin expression, E-cadherin/catenin adhesion complexes and β -catenin signaling during tumor progression

Group Leader: Amparo Cano

Our studies are intended to understand the molecular mechanisms responsible for the downregulation of E-cadherin expression and function which occurs during tumor progression, and more specifically at tumor invasion in experimental systems (i.e. mouse skin carcinogenesis) and in human tumors. In addition, we are also interested in understanding the mechanisms involved in the modulation of β -catenin signaling during tumor progression. In relation with the mechanisms involved in the regulation of E-cadherin gene expression, our previous studies on the E-cadherin promoter in different cell lines from the mouse skin carcinogenesis system indicated a major repressor role for the E-pal element (-90 to -70) as well as the modulatory role of a proximal CE region (-108 to -86) containing an Ets-binding site. Using the one-hybrid approach we have been able to identify three transcription factors interacting with the wild type version of the E-pal element. One of the factors identified correspond to Snail, a Zn-finger transcription factor of the Snail family previously showed to be involved in epithelial-mesenchymal transitions (EMTs) in embryonic development. We have now showed that Snail is a strong repressor of E-cadherin promoter activity, and its ectopic expression in different epithelial cell lines triggers EMT concomitantly to the loss of E-cadherin expression and the acquisition of invasive and tumorigenic properties. In addition, the analysis of endogenous Snail and E-cadherin expression in murine and human cell lines and tumors indicate a strong inverse correlation between the expression of both molecules, specifically at the invasive areas. These data indicate that Snail controls EMTs which occur at tumor invasion by repressing E-cadherin expression and may be considered as a marker of tumor invasion. At present we are characterizing the molecular mechanism of repression of the E-cadherin promoter activity by Snail, as well as characterizing the other two transcription factors identified by the one-hybrid approach.

With regard to the modulation of E-cadherin function our recent studies are focused on the effects of H-ras activation on the E-cadherin/catenin adhesion complexes and β -catenin signaling in mouse epidermal keratinocytes. Oncogenic activation of H-ras (V12H-ras) in Pam212 keratinocytes induced the destabilization of E-cadherin/catenin complexes from the cell-cell contacts and the cytoplasmic relocalization of β -catenin. These effects are concomitant to the loss of β -catenin/APC interaction and a significant decrease in P-Ser β -catenin, and lead to the metabolic stabilization of cytoplasmic β -catenin. Interestingly, those effects are independent of the GSK-3 β activity, involved in the phosphorylation of β -catenin and its cytoplasmic stability through the Wnt signaling pathway. However, the effects of V12H-ras on β -catenin relocalization and metabolic stabilization in Pam212 keratinocytes depend on the activity of PI3K, a H-ras effector. A specific β -catenin/PI3K complex has been detected in Pam212 keratinocytes, being significantly increased in Pam212 cells overexpressing V12H-ras. On the other hand, stable expression of a constitutively active form of PI3K (p110 α -CAAX) in Pam212 cells is sufficient to inhibit the β -catenin/APC interaction and lead to the metabolic stabilization of β -catenin and its nuclear translocation. These results indicate that β -catenin signaling can be induced by

oncogenic activation of H-ras by mechanisms independent of the Wnt/GSK-3 β pathway, or β -catenin mutation, and involving the participation of PI3K. At present, we are characterizing in further detail the specific mechanism by which PI3K contributes to β -catenin signaling, the specific kinase(s) involved in β -catenin phosphorylation in this system, as well as investigating the mechanisms of nuclear translocation of β -catenin.

In addition to the above mentioned specific research lines, we continue investigating other aspects of tumor progression, such as the relation between E-CD and/or β -catenin signaling and metalloproteinases expression (in collaboration with Dr. A. Fabra), the organization and function of tight junctions in relation to E-CD and H-ras activation (in collaboration with Dr. L. González-Mariscal), the expression of APC and catenins in human breast carcinomas (in collaboration with Dr. C. Gamallo and Dr. J. Palacios) and the anti-tumor effects of the E1A gene of adenovirus (in collaboration with Dr. S. Ramón y Cajal and Dr. M. Quintanilla).

Signal transduction mechanisms altered after transformation by oncogenes of the Ras superfamily.

Group Leader: Juan Carlos Lacal

Understanding the molecular basis of carcinogenesis is of utmost importance for the development of new anticancer strategies. To that end, it is essential to unravel the regulation of both normal cell proliferation and its alterations in cancer cells. We have previously demonstrated that in oncogene-transformed cells such as *ras*, *raf* and *src*, there is an increased level of phosphorylcholine (*PCho*) resulting from a constitutive activation of phospholipase D (PLD) and choline kinase (ChoK). We have also demonstrated the importance of ChoK for the regulation of cell proliferation, since inhibition of this enzyme drastically reduces entry into the S phase after stimulation with growth factors. Furthermore, *PCho* itself has mitogenic activity. We have recently reported the synthesis of new highly specific inhibitors for ChoK that drastically reduce entry into the S phase after stimulation with specific growth factors. A more profound inhibition of cell proliferation was observed in cells transformed by oncogenes such as *ras*, *src*, *raf* and *mos* in the presence of ChoK inhibitors, compared to their parental cells. This effect was not observed in cells overexpressing the *fos* oncogene. While *ras*, *src*, *raf* and *mos* transformation is associated with elevated levels of ChoK activity, *fos* expression does not affect ChoK.

The inhibitory effect on proliferation of ChoK inhibitors correlates well with their ability to inhibit the production of phosphorylcholine in whole cells, a proposed novel second messenger for cell proliferation. Here we describe the characterisation of ChoK inhibitors with antiproliferative properties against human tumour-derived cell lines. The new molecules were tolerated in mice at doses that showed *in vivo* antitumor activity against human tumour xenografts derived from HT-29 and A431 cell lines implanted subcutaneously in nude mice. These results strongly support a critical role of choline kinase in the regulation of cell growth and makes this enzyme a novel target for the design of anticancer drugs. This first generation of inhibitors provide *in vivo* evidence that blockade of *PCho* production is a valid strategy for the development of new anticancer agents, opening a new avenue for the development of antitumor drugs with a novel mechanism of action.

It has long been accepted that some oncogenes and oncosuppressor genes are involved in cell death as well as in proliferation. The Rho GTPases form a subgroup of the Ras superfamily of GTP binding proteins that regulate a wide spectrum of cellular functions. The Rho GTPases function cycling between an active GTP-bound state and an inactive GDP-bound state. Activated Rho GTPases interact with intracellular target proteins or effectors to trigger a wide variety of cellular responses including the reorganization of the actin cytoskeleton, cell cycle progression, adhesion, metastasis, and gene transcription. Some members of the Rho GTPases family also play a role in apoptosis. On such behalf we have reported that the human genes *rho A*, *rho C* and *rac 1* are capable of inducing apoptosis in different cell systems like NIH 3T3 fibroblasts and the human erythroleukemia K562 cell line after serum deprivation. We have investigated the mechanism involved in this process and have demonstrated that apoptosis induced by Rho proteins is independent of p53 and is sensitive to expression of Bcl 2 protein *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, overexpression of *rho* induces the activation of an endogenous sphingomyelinase, and induction of apoptosis by overexpression of the human Rho A and Rho C proteins correlated with an increase in ceramide levels, a putative second messenger for apoptosis. Furthermore, It was then verified that Rho-induced apoptosis is indeed mediated by generation of ceramides. Moreover, *vav* and *ost*, two guanine exchange factors for Rho proteins with oncogenic properties, were also able to induce apoptosis under similar conditions. We have seen also that Rho proteins play an important role in the physiological regulation of the apoptotic response to stress-inducing agents since a dominant negative mutant of Rac 1 interferes with the induction of apoptosis by TNF α .

Molecular genetics of neurogenic tumors: diagnostic markers and progression mechanisms

Group Leader: Angel Pestaña

Current research interest of the group is centered on the gene expression profile of Ewing's tumors. The Ewing family of tumors of neuroectodermal origin has been defined by the presence of an EWS-ets gene rearrangement whose fusion transcript acts as a transforming transcriptional factor. Most of the Ewing's tumor (85 %) carries a t(11;22) translocation generating a EWS/FLI-1 fusion transcript. The remaining 15 % of the cases other chromosome 22 (EWS) translocations lead to the formation of other EWS/ets fusion transcript (EWS/ERG being the second most frequent). Besides these differences in fusion transcripts, the rearrangements show other kind of molecular diversity in the different combinations of exons from EWS and FLI-1. In this case the most frequent fusion (type 1) links EWS exon 7 in frame with exon 6 of FLI-1. Interestingly, these fusion structures have been shown to be of prognosis value. Although the aberrant genes resulting from EWS/ets fusion may be related to clinical heterogeneity and response to treatment of Ewing's tumors, little is known about the variety of gene expression induced by the fusion transcripts. In an attempt to gain insight into this question we propose to carry out a profiling of gene expression using SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) and micro arrays in tumor cell lines expressing the EWS/FLI fusion transcript and in normal human cells transfected with the DNA rearrangements.

Intercellular communication and cellular signaling in normal and tumor cells

Group Leader: Antonio Villalobo

Our group is interested in the study of different mechanisms of intercellular communication and cellular signaling in normal cells and their alterations in tumor cells. Among the projects in progress are: i) The study of the phosphorylation of calmodulin by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase with emphasis on the functional consequence of this phosphorylation on the biological activity of calmodulin when acting on different calmodulin-dependent systems, and the regulatory role of phospho(Tyr)calmodulin on this receptor; ii) The study of the regulation of the EGFR by the calcium signal and the cross-talk between the calmodulin/phospho(Tyr)calmodulin system and the protein kinase C system regulating the receptor in intact cells; iii) The study of the physiological consequence of the mutagenesis of the calmodulin-binding site of the EGFR; iv) The identification of different calmodulin-binding proteins implicated in cellular proliferation mediated by the EGFR and the study of their functional roles; v) The characterization and the study of the physiological role of ecto 5'-phosphodiesterases/nucleotide-pyrophosphatases in normal and tumor cells; vi) The study of the regulatory roles of nitric oxide on EGFR-mediated cellular proliferation, the activation of the p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) pathway, and the activation of NOIPP-58, a newly discovered Nitric Oxide-Induced 58 kDa Phospho Protein; and vii) The study of the action of b-galactoside-specific animal lectins on cellular proliferation.

2. Department of Biochemistry and Genetics of Yeasts

ABC transporters: structure-function relationships

Group Leader: Pilar Eraso

Our main interest is the analysis of the structure-function relationships of ABC transporters. For this purpose we are using as a model the yeast cadmium factor, Ycf1, a vacuolar ABC protein involved in resistance to Cd²⁺ and to exogenous glutathione S-conjugate precursors in yeast. The ABC transporter superfamily includes human proteins such as CFTR (Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator) or MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein). Ycf1 has strong sequence similarity with CFTR and MRP1, which suggests a similar overall structure. In a first approach, we have performed a mutational analysis of the protein generating 22 mutations by site-directed mutagenesis in NBD1, NBD2, TMD2 and R domains. Characterization of the mutants led to the identification of essential residues for Ycf1 transport activity, biogenesis and regulation. In a second approach we have performed an intragenic suppressor analysis of six inactive mutations located in NBD1, NBD2 or R domains of Ycf1. In a third approach we are studying if the intragenic suppressor mutations identified in Ycf1 have similar properties when introduced into human CFTR.

Relations between glycolytic flux and the effects produced by sugars in yeast.

Group Leader: Carlos Gancedo

In the study of mutants that suppress the toxic effects of sugars on different glycolytic mutants we have shown that mutations in the genes *GAL2* or *GAL 4* are able to eliminate the effects of galactose on *gpm1* or *pyc1 pyc2* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. We are trying to characterize the genes responsible of other mutations that suppress the toxic effects of different sugars in the above mentioned mutants.

We have shown that the gene that encodes the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*, possesses an intron. The protein, very sensitive to inhibition by trehalose-6-P exhibits a loop absent from other hexokinases.

We have studied the gene *TPS1* from the yeast *Candida albicans*. Disruption of both chromosomal copies impairs hyphae formation and decreases infectivity of the organism. We have initiated the study of the gene *MIG1* from this yeast.

Catabolite repression in yeast and control of morphogenesis

Group leader: Juana M. Gancedo

Research topics: Role of cAMP in *FBP1* transcription; Elements which regulate pseudohyphae formation in *S. cerevisiae*; Glucose signaling; Regulation of the protein kinase Snf1.

We have shown that cAMP has a strong repressing effect on one of the UASs from the *FBP1* gene that may be mediated through its repression of the genes *CAT8* and *SIP4* which encode transcription activators. We found also that cAMP is able to induce pseudohyphal and invasive growth in *S. cerevisiae* in a variety of stress conditions. We have established that glucose signaling involves the interaction of the glucose sensors Snf3 and Rgt2 with the regulatory protein Mth1. Nevertheless we could show that glucose signaling may also occur in the absence of both Snf3 and Rgt2. We are investigating the existence of genes which can make the protein kinase Snf1 active in the presence of glucose, when overexpressed.

Turnover of plasma membrane proteins in yeast. Mechanisms of endocytosis

Group Leader: Rosario Lagunas

Addition of glucose to yeast cells starved of a nitrogen source triggers endocytosis and degradation in the vacuole of a number of plasma membrane proteins. This inactivation is called "catabolite inactivation" and our results suggest that it is due to the stimulation of the general protein turnover that occurs during nitrogen starvation. Endocytosis is inhibited by the presence of low concentrations of ethanol. We have found that yeast cells accumulate trehalose when a remodeling of the plasma membrane and, therefore, of endocytosis is required for yeast survival. We have also found that this accumulation circumvents the inhibition of endocytosis by ethanol. Using mutants defective in the heavy chain of clathrin and in several subunits of the COPI and COPII complexes, we have found that clathrin, as well as two cytosolic subunits of the COPII, Sec23p and Sec24p, could be involved in endocytosis of the 12-transmembrane segment

protein (12-TMS) maltose transporter. The results also indicate that endocytosis of this transporter and of the 7-TMS α -factor receptor could have different requirements.

Yeast Genes Functional analysis

Group Leader: María J. Mazón

1. Phenotypic analysis of the null mutants in six genes previously sequenced and cloned was performed. Strains carrying a deletion in *YGL133w* showed reduced mating efficiency and aberrant cellular morphology. This phenotype was only detected in the *MAT α* mutant but not in *MAT a*. Ygl133 protein was shown to localize to the nucleus using a GFP fusion protein. The mutant strain constitutively expresses *FUS1*, a pheromone induced gene in wild type cells.

2. We have shown that the 45 residue amino extension of **aminopeptidase I** (API) is necessary and sufficient to target GFP to the vacuole. We undertook a search for proteins able to interact *in vitro* and/or *in vivo* with this amino extension and found that Ssa1, a member of the Hsp70 chaperone family, is specifically retained by the prepro-peptide immobilized on a resin. We are studying API processing in a *ssa1^{ts}* mutant strain.

3. We are interested in the possible role of the amino terminal domain of the Ycf1 protein in its intracellular sorting to the vacuole and in protein function. We have shown that deletion of the 4 transmembrane segments of the amino terminal domain abolishes protein function while the protein is correctly localized. We are also studying the role of Ycf1 phosphorylation on its function. We have produced three mutants affecting the consensus site for PKA phosphorylation, located in the regulatory domain of Ycf1 : Ser⁹⁰⁸/Ala, Ser⁹⁰⁸/Asp and Ser⁹⁰⁸/Glu, and are presently studying the transport ability of the mutant proteins and the effect of PKA phosphorylation on the wild type protein.

Molecular analysis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase.

Group Leader: Francisco Portillo

Our main interest is to study the regulation of the yeast plasma membrane ATPase by glucose. Glucose triggers transcriptional and post-transcriptional mechanisms which increase the level and the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*.

At the transcriptional level, we have found that glucose-dependent ATPase gene expression is regulated by a lipid-mediated signal transduction pathway. In addition, we have investigated the post-transcriptional activation of the enzyme and have found that the Bck1/Mkk1/Mpk1 MAP kinase signalling pathway is implicated in this activation.

3. Department of Cellular and Molecular Endocrinology

Regulatory mechanisms by thyroid hormone in the Central Nervous System

Group Leader: Juan Bernal

Our work is directed towards understanding the basic processes whereby thyroid hormone influences brain development and function. In the past, we identified a series of genes whose expression is regulated by thyroid hormone in the rat brain. One of these genes is RC3/neurogranin, which encodes a protein kinase C substrate. RC3 is regulated by T3 directly at the transcriptional level and thus probably by interaction of the T3 receptor with genomic regulatory sequences. In previous work we isolated the promoter region and flanking sequences and found no T3-responsive elements (TRE) up to 6 kbp upstream of the promoter. To identify the TRE we used the whole human gene (11 kbp). Labelled restriction fragments were incubated with T3 receptor and immunoprecipitated with a receptor antibody. In this way we could isolate a DNA fragment that specifically bound the T3 receptor. Further analysis by footprinting, EMSA and transactivation of reporter genes demonstrated the presence of the TRE in the first intron, 3 kbp downstream of the origin of transcription.

To identify striatal genes regulated by thyroid hormone we screened a collection of cDNA clones corresponding to mRNAs that were enriched in striatum. One of these clones, SE6C, was found to dependent intensely of thyroid hormones. Isolation of the full length cDNA and conceptual translation of the ORF revealed that the SE6C clone encoded a novel protein with all the features of the small GTP binding proteins of the Ras family, which we have named Rhes (Ras homolog enriched in striatum). Rhes shares 65% identity with dexras, another Ras family member inducible by dexamethasone. Studies are in progress to define the Rhes effector pathways.

The concentration of T3 within the brain is critically dependent upon the activity of the deiodinases. These selenium-containing enzymes are of three types, of which type 2 (D2) and 3 (D3) are of special interest in the brain. D2 removes the iodine atom in the 5' position of T4 to generate the active hormone, T3. D3 generates inactive metabolites, rT3 from T4 and T2 from T3, after removal of the iodine in the 3 position. About 80% of brain T3 is generated locally through D2 activity. Also, D2 activity increases in hypothyroidism, and thereby tends to maintain T3 concentration in the face of a decreased T4. We have studied D2 and D3 expression in brain by in situ hybridization. D2 is expressed in glial cells (protoplasmic astrocytes and tanocytes), and is selectively increased by hypothyroidism in all the relay stations and cortical targets of the somatosensory and auditory pathways. This suggests that these pathways are specifically protected by D2 against hypothyroidism and that therefore thyroid hormone might have an important, previously unrecognized role in the development of these structures. On the other hand, D3 is expressed only in neurons. During the early postnatal period, D3 is selectively expressed in nuclei related to sexual differentiation of the brain, such as the bed nucleus of stria terminalis, the preoptic area and the medial amygdala. The results suggest that there is a need for exquisitely regulated T3 concentrations in these areas, although its biological meaning is still unknown.

Activaton and differential signaling of Ras proteins

Group Leader: Piero Crespo

Our group research interests are mainly focused in the regulation of Ras and other related GTPases and their signaling pathways, with special attention on MAP kinases routes. We are at present investigating the role of the DH domain harbored in Ras exchange factors in the regulation of Ras activity. We have found that Ras-GRF DH domain is essential for activating Ras/MAPK by regulating Ras-GRF access to the membrane. A process that we have found to be regulated by the GTPase Cdc42.

We are also investigating the differential roles of Ras proteins H, K and N-Ras. For that purpose we have generated dominant inhibitory mutants of each Ras isoform and found them to be specific in their inhibiting activities. We will process to use these tool in investigating the role of the three Ras in the regulation of cell cycle progression.

With regards to MAP kinases, one of our main interest is the role played by these in leukemogenesis. In this respect we have found that, unlike most cellular systems, myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of ERK1/2 activation.

Finally we are also focusing our attention on Mxi2, an splicing isoform of p38. Interestingly we have found that this MAP kinase exhibits differential regulation and substrate specificity when compared to p38.

Thyroid hormone status at different stages of development

Group Leaders: Gabriela Morreale de Escobar and Francisco Escobar del Rey

Extrathyroidal adaptations to thyroid hormone deficiency and excess: Research topics: a) Thyroid status of adult thyroidectomized rats on T3 infusions; b) Thyroid status of different tissues in adult rats on varying iodine intakes.

Maternal-fetal communication: Research topics: a) Thyroid hormones in early human embryonic compartments; b) Iodine nutrition of premature infants; b) Effects of maternal treatment with TRH and glucocorticoids on fetal thyroid status in rats with and without nitrofen-induced pulmonary immaturity.

Iodine deficiency studies: Research topics: a) Situation of iodine nutrition in different areas of Spain; b) Iodine deficiency in pregnant and lactating women; c) Experimental iodine deficiency disorders: treshold for brain damage; d) Brain damage in progeny of severely iodine deficient (hypothyroxinemic) rats: altered migration of brain cells.

Biology of nuclear hormone receptors: studies on brain development and cancer

Group Leader: Alberto Muñoz

Our group is focussed on the study of the effects of the nuclear receptors for thyroid and glucocorticoid hormones, vitamin D, and retinoic acid on different aspects of central nervous system development and cancer. In the developing rat brain we use diverse molecular approaches such as differential PCR or subtractive hybridization to search for novel genes under thyroid hormone control. Identified target genes are studied *in vivo* in the rat brain and in cultured nerve cells to know the mechanism of control and their spatial and temporal pattern of regulation by standard molecular techniques as well as by *in situ* hybridization and immunohistochemistry.

In both colon and mammary epithelial cells, we investigate the effects of dihydroxyvitamin D3 and thyroid hormone on gene expression, proliferation, phenotype, and tumorigenicity. Finally, we also interested in the molecular mechanism of the antagonistic effect of activated nuclear hormone receptors on AP-1 action, and on the effects of *v-erbA* oncogene encoding a mutated form of the thyroid receptor in glial cells.

Regulation of brown adipocytes proliferation and differentiation. Regulation of deiodinases by thyroid hormones.

Group leader : María Jesús Obregón

Research topics:

Our main interest is the study of the activation of brown adipose tissue, a highly thermogenic tissue. For this, we use primary cultures of brown adipocytes, and the pathways that lead to the activation of proliferation and differentiation of brown adipocytes are examined.

UCP-1 mRNA gene expression is regulated in brown adipocytes by NE, thyroid hormones, retinoic acid, insulin and glucocorticoids. Besides UCP mRNA expression, the regulation of UCP promoter is also studied.

Regulation of type II 5'Deiodinase (D2) activity and mRNA in cultured brown adipocytes. 5'D-II is adrenergically stimulated by NE and T3 is required for such stimulation; on the other hand growth factors, thyroid hormones and NE induce 5D activity and mRNA.

Regulation of Deiodinase activities in fetal rat tissues. Those studies are carried out mainly in situations of iodine deficiency or thyroid hormone substitutive therapy.

Signal transduction and transcriptional mechanisms involved in the control of cell growth and differentiation: Role of tissue-specific transcription factors.

Group leader: Pilar Santisteban

Research topics: a) Hormonal regulation of thyroid-specific genes: role of transcription factors (tissue-specific and constitutive) and chromatin remodeling. b) Control of thyroid cell proliferation: signalling and cell cycle proteins. c) Tissue-specific transcription factors in the control of lung-specific gene expression. d) Transcriptional control of cytosolic malic enzyme (ME) gene expression.

The main interest of our group is focused in the transcriptional regulation and growth control by extracellular signals. To deep inside both mechanisms we have used different cell systems and functional approaches. One of the most used cell systems in our laboratory is the FRTL-5 thyroid epithelial cells. These cells express a set of tissue specific genes (thyroglobulin, thyroperoxidase and Na/I⁻ symporter) responsible for the thyroid hormone synthesis. We have studied the transcriptional regulation of these genes by hormones and growth factors demonstrating that thyroid-specific transcription factors and constitutive factors participate in this control. The thyroid specific factors are members of the homeo-box (TTF-1), forkhead (TTF-2) and paired-box (Pax-8) families. TTF-2 plays an essential role in the hormonal control of thyroid gene transcription interacting physically and functionally with CTF/NF1, a constitutive

transcription factor. Since TTF-2 is a forkhead transcription factor and due to the structural similarity of these factors with linker histone proteins, we have started the study of how changes in higher order chromatin structure control thyroid-specific gene transcription. Interestingly, the homeo-box gene TTF-1 is not only expressed in thyroid but also in lung, playing a decisive role in its development and morphogenesis. In a model of fetal lung hypoplasia we have shown that TTF-1 is down-regulated and that glucocorticoids revert this effect. We are currently studying the mechanisms of action of glucocorticoids and the differential expression of TTF-1 in thyroid and lung cells.

The cytosolic malic enzyme (ME) gene is a housekeeping gene whose transcription is controlled by thyroid hormones and insulin. We have identified in the promoter of this gene an insulin response element bound constitutively the transcription factors Sp1 and Sp3. The early growth response gene *Egr-1* binds to this element in response to insulin via Ras/MAPK. Recently we have shown that ME gene is up-regulated by dioxin-like compounds through a xenobiotic response elements (XRE) that matches in its position with a thyroid hormone response element (TRE). Dioxin-like compounds induce, an still unidentified, nuclear protein that binds this XRE/TRE.

We are also interested in studying the control of thyroid cell growth. In the thyroid gland there are two types of cells: epithelial (or follicular) and parafollicular. Each one expresses different specific genes and have a different response to external signals. We have demonstrated the existence of an autocrine loop in the control of thyroid epithelial cells that involves the positive effector thyrotropin (TSH) and the general inhibitor somatostatin (SS). Our more recent data show that TSH control of epithelial thyroid growth involves both PKA and PI3-K pathways. PKA is responsible for TSH-induction of HMG-CoA reductase, RhoA and Cdk-2 activation, and down-regulation of p27^{kip}, whereas PI3-K increases cyclin E. Both pathways finally converge increasing cyclin E-Cdk2 complexes. SS exerts its antiproliferative effect upstream of PKA and PI3-K interfering with the TSH-induction of cAMP and adenylyl cyclase activity. We are now studying in more detail the existence of a PKA-dependent and a new one-independent PI3-K pathways in the TSH/cAMP mediated proliferation of epithelial thyroid cells.

The parafollicular thyroid cells are transformed in medullary thyroid carcinoma (MTC). In a MTC cell line, we have shown that the p53 locus is rearranged and in parallel these cells do not express the oncoprotein MDM2. The introduction of MDM2 in this p53-deficient MTT cells promotes apoptosis. MDM2-mediated programmed cell death is at least mediated by a down-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-2 and an increase in caspase-2. We are now studying in the same mechanism in epithelial cells as well as the functional role of this apoptotic process induced by MDM-2.

Molecular mechanisms of neural differentiation

Group Leader: Mario Vallejo

Research interests in our laboratory are focussed on the transcriptional mechanisms that regulate cell-specific gene expression in forebrain neurons. We have established neural cell lines derived from rat embryonic cortex that retain phenotypic features of neural precursors. Using these cells, we found that activation of the cAMP-dependent signaling pathway induces astrocytic differentiation. These studies have been extended using primary cultures of cortical

precursor cells to identify neurotrophic factors that induce the differentiative response and to elucidate in detail the intracellular signaling mechanisms involved. Our ultimate goal is to understand the transcriptional mechanisms acting on target genes to trigger this response.

We are also interested in the study of homeodomain transcription factors that may play a role in brain development. In particular, we are focussing our attention on two homeodomain proteins identified in our laboratory, named Opx-1 and Drx-1, expressed in the perineural mesenchyme and central nervous system during embryonic development. In addition, we have identified the expression of IDX-1 in the developing central nervous system. IDX-1 is a homeodomain transcription factor whose expression was previously thought to be restricted to pancreas and gut. Our studies are directed at understanding its possible role on central nervous system development.

4. Department of Enzymology and Molecular Pathology

Structural bases of control, expression and interaction with microtubule formation of eukaryotic phosphofructokinases. Evaluation of intestinal lactase in vivo with galactosylxyloses.

Group Leader: Juan J. Aragón

Our research includes:

Structural analysis of control and expression of phosphofructokinase (PFK) from eukaryotic cells. Construction of chimeric PFKs by exchanging the N- and C-terminal halves between the M and C isozymes from muscle and ascites tumor, respectively, allowed us to examine the functional contribution of each domain to catalysis and allosteric control. This study, in conjunction with the characterization of several mutants of the non-allosteric enzyme from *Dictyostelium discoideum*, pointed to several amino acid residues which role in allosteric binding sites we are testing by specific mutations and other structural approaches. We are also investigating the control of expression of tumor PFK-C to account for its high content in malignant cells and its pattern of expression during tumor development.

Interaction of *D. discoideum* PFK with microtubule formation. This PFK was found to be a potent and specific inhibitor of tubulin polymerization. Now we have evidenced the formation of tubulin-PFK complexes and are investigating the possible role in vivo of this inhibitory effect by several approaches.

Utilization of 4-galactosylxylose in the evaluation of intestinal lactase in vivo as a possible diagnostic procedure for lactose intolerance. Oral administration of 4-galactosylxylose to suckling rats leads to urinary excretion of xylose which can be determined by a simple colorimetric method. Other advantages of this procedure related to the correlation with changes in intestinal lactase levels and the synthesis and doses of disaccharide made us to propose this procedure as a suitable non-invasive diagnostic method for lactase deficiency in humans. Efficiency of several galactosylxylose isomers has been evaluated and the correlation between blood xylose with enzyme level after administration of the disaccharide is now being assessed as an alternative procedure in pediatrics in near-future clinical tests.

Structural and functional characterization of novel human genes

Group Leader: Antonio Coloma

The research activities in our lab are focused in the characterization of novel human genes, which have been identified through its sequence homology to the corresponding genes from other organisms. We have recently reported on the structure of two genes: *NRGN*, positioned at 11q24, encoding neurogranin, a protein of neuronal expression regulated by thyroid hormone; and *POMT1* which encodes a putative O-mannosyltransferase, according to its homology to yeast Pmts. POMT1 is homologous to *Drosophila rotated abdomen*. We are currently investigating the function of the proteins encoded by both genes, as well as its possible involvement as a cause of genetic disorders.

Control of expression and modulation of enzymatic activities in yeast and developing systems.

Group Leader: Claudio Fernández de Heredia

We have continued the work on these two topics: a) study of mutual interactions in the metabolism of mono- and disaccharides in *Saccharomyces cerevisiae* and b) enzymes acting on 2',3' cyclic nucleotides. In relation with the first subject, we have seen that secretion of glucose from maltose, in response to the presence of fermentable hexoses in the media, requires the intracellular hydrolysis of maltose and involves, in addition to the maltose transporter, a very labile component(s) that is inactivated by incubating the cells with mixtures of maltose and any of the fermentable hexoses. This component(s) re-appears again by incubating the cells with maltose and this process is blocked either by cycloheximide or any of the fermentable hexoses. In relation with the second point, we have finished the characterization of the 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase from *Fusarium culmorum*, and we have developed an enzymatic method for the quantitative determination of micromolar concentrations of cytidine 2'-phosphate even in the presence of at least five times greater concentrations of a variety of related nucleotides. The method is also suitable for detection of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (EC 3.1.4.37) and its discrimination from the 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase (EC 3.1.4.16).

Mechanisms of cellular resistance to antifolates: Evaluation of folate-dependent enzymes inhibitors as antitumoral drugs.

Group Leader: Pilar Llorente

The inherent or induced resistance of certain tumors to cytotoxic drug therapy is a major clinical problem. There are many mechanisms of drug resistance elucidated principally from "in vitro" studies. These include mutation of target genes, amplification of target and mutated genes, differences in repair capacity altered drug transport, differences in nucleoside and

nucleobase salvage pathways and , in the case of antimetabolites as antifolates , polyglutamylolation .

The essential requirement for folilpolyglutamates for celular viability and the importance of antifolates polyglutamates in cytotoxicity suggest that alterations in polyglutamate synthesis could have profound therapeutic effects. Alterations in polyglutamate synthesis can be arrived at indirectly, by changes in the one-carbon distribution in the folate pool ,o directly through effects on FPGS. In the latter regard our studies have been useful in developing compounds which interact and / or inhibit the FPGS activity. These compounds, mainly pterin derivatives, are hidrolysis intracelular products of natural folates and classical antifolates as MTX.

Metabolism and function of dinucleoside polyphosphates

Group Leaders: Antonio Sillero and María Antonio Gunther Sillero

Metabolic aspects of purine nucleotide metabolism in rat brain cytosol. The cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase (c-N-II) from rat brain has been purified from rat brain cytosol and found that it is activated by dinucleoside polyphosphates and by inorganic polyphosphates (K_a , micromolar. We have made a systematic study of the metabolic fate of AMP throughout incubation of this nucleotide with fresh cytosol obtained from rat brain and following the kinetic of disappearance of AMP and the appearance of its degradative products, by HPLC. In order to quantify the kinetic behavior of these reactions, two complementary approaches are being followed: i) the V_{max} and K_m values of the enzymes acting in the intermediate steps of the reactions were experimentally determined in fresh extracts; ii) these data were introduced into differential equations that describe the concentration of AMP and its degradative products along the time of incubation. The differential equations were solved with the help of the Program Mathematica 3 running in a Power Macintosh G3.

Mechanisms of the reaction catalyzed by firefly luciferase (EC 1.12.13.7). This mechanism is being explored through the use of potential specific inhibitors of two of the reactions catalyzed by this enzyme: light production and synthesis of dinucleoside polyphosphates. The syntheses of these compounds by cells carrying the gen for this enzyme is also being investigated.

Synthesis of dinucleoside polyphosphates. The synthesis of these compounds catalyzed by DNA and RNA ligases has been explored

5. Departement of Structure and Function of Biomolecules

Regulation and function of COT/Tpl-2 kinase in T cell activation

Group Leader: Susana Alemany

We have recently shown that COT kinase is implicated in the T lymphocyte G0/G1 transition. We are currently studying:

1) Implication of COT kinase in the G1/S transition of T lymphocytes and the regulation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 activity (A.Velasco, R. de Gregorio)

2) Regulation of COT promoter and COT mRNA levels by activatory T signals (R. de Gregorio).

3) Changes in the phosphorylation state of COT kinase and correlation with changes in its activity (M. Gandara and R. Hernando)

The rate limiting step in the synthesis of prostaglandins is the conversion of arachidonate to prostaglandin H₂, which is catalyzed by two isozymes COX-1 (cyclooxygenase-1) and COX-2 (cyclooxygenase-2) COX-1, that has been involved in “housekeeping” functions, is a constitutive enzyme expressed in many tissues and also in platelets In contrast, COX-2 is an inducible enzyme. The regulation of COX-1 activity is thought to be responsible for the gastric and renal side effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs, as well as for their antithrombotic activity. On the other hand, the antiinflammatory capacity of the different nonsteroidal antiinflammatory drugs, is now proposed to be associated with the capacity of inhibiting COX-2 activity. We are currently the capacity of metamizol to inhibit COX-1 and COX-2 activities using different cell systems.

Molecular mechanisms implicated in megakaryocytic polyploidization

Grup Leader: Carmela Calés

We are interested in elucidating the molecular mechanisms by which human megakaryocytes become polyploid as part as their physiological maturation program. The experimental system we are using is based in the comparison of two established cell lines with megakaryoblastic features which respond to phorbol esters by differentiating towards mature forms of megakaryocytic lineage. However, whereas one of them (HEL) enters an endoreplication cycle and becomes polyploid, the other (K562) does not. We have demonstrated that both G1/S cyclins (E and A) and their inhibitors (p27^{kip1} and p21^{cip1}) are differentially regulated, and furthermore, that ectopic over-expression of cyclin E determines the polyploidization of K562 cells. We have also studied the putative role of transcriptional regulators in the establishment of such truncated cell cycle, and shown that ectopic expression of a *Drosophila* repressor and endocycle regulator, *esg*, inhibits HEL endoreplication.

We are also exploiting the fact that fetal megakaryocytes appear to have a diminished platelet production capability, compared to adult cells. We have observed that megakaryocytes cultured from umbilical cord blood do not become polyploid, in contrast with megakaryocytes obtained from peripheral adult blood, which attain DNA content up to 64N. We are currently combining both approaches (established cell lines and primary megakaryocytes) to further investigate the role of G1/S cyclins and inhibitors, as well as transcriptional regulators, in the establishment of endoreplication cycles and its effect on platelet production.

Biomedical Applications of Magnetic Resonance

Group Leader: Sebastián Cerdán

Our lab is involved in a variety of projects developing applications of Magnetic Resonance methods to biochemical and biomedical problems. Topics currently covered include; quantitative

analysis of neuronbal-glia interactions in the adult brain, pH homeostasis in cancer and pH imaging by 1H MRSI, Intelligent tumor diagnosis by MR, neural networks and multivariate analysis, water structure and dynamics in cells and tissues and intracellular organization of metabolism.

Cellular Regulation by Proteolysis.

Group Leader: José G. Castaño

The ubiquitin-proteasome pathway is responsible for most part of nuclear and cytoplasmic degradation within the cell. We are studying several aspects of the regulation of proteasome activity and assembly. Recent results (see publications) are centered in a new activity for proteasomes, limited proteolysis of a substrate (as demonstrated for GRK2). This newly identified activity opens another way of regulation of enzyme activity by the proteasome, instead of total degradation to oligopeptides. In the study of the assembly line of 20S proteasomes within the cell we have shown that pro- β 5 N-terminal processing is coupled to its incorporation into precursor or mature proteasome complexes, depends on proteasome activity and takes place in the cytosol. Finally, we are also studying mitochondrial proteolysis and we characterized the human homologue (HClpP) of the bacterial ClpP protease, whose subunit composition and oligomeric structure is similar to the bacterial protein.

Study of the function of a casein kinase I from *Dictyostelium discoideum*

Group Leader: Margarita Fernández

The main goal of this project is to study the function of a casein kinase I in *Dictyostelium discoideum*. We have cloned and characterized a 49 kDa form of casein kinase I (CKI) from this organism. The predicted amino acid sequence shares 70% identity with the catalytic domain of the mammalian ϵ and δ isoforms, the *Drosophila* CKIe and the *S.pombe* Hhp1, and 63% identity was also found with Hrr25, a 57 kDa form of casein kinase I from yeast involved in DNA repair. *Dictyostelium discoideum* CKI is expressed in vegetative asynchronous cells, as well as in differentiated cells as detected by northern analysis. The level of CKI expression does not change during the cell cycle. Antibodies raised against a truncated version of the protein recognize a 49 kDa protein from *Dictyostelium* extracts. The protein expression parallels the pattern found for the RNA. The *Dictyostelium discoideum* CKI expression in *Escherichia coli* resulted in an active enzyme that autophosphorylates and phosphorylates casein. Immunofluorescence assays shows that DdCKI is localized in the cytoplasm and nuclei of *Dictyostelium* cells.

We have been unable to obtain disruptants of the casein kinase I gene, suggesting that this protein is essential for vegetative growth of *D. discoideum*. Overexpression of DdCKI renders cells that are more resistant to hydroxyurea suggesting a potential role for this kinase in DNA repair. We are at the present using other approaches to obtain further information on the function of this protein a) we are obtaining transformants using a construct of a dominant negative version of DdCKI under the control of genes expressed only in differentiation b) we are making a

construct in which the carboxi terminal portion has been deleted (Putative dominant version of the kinase) with the aim to study the phenotype of the transformants obtained.

The role of the Src family on the cellular proliferation/differentiation induced by cytokines

Group Leader: Jorge Martín-Pérez

Cytokines regulate a large number of physiological functions through interaction with their receptors. The cytokine receptors have not intrinsic enzymatic activity. Cytokine binding results in receptor dimerization, activation of the preassociated members of the Jak and Src family of tyrosine kinases and on tyrosine phosphorylation of cellular proteins, including the receptor and additional molecules implicated in signalling cascades, that in turn regulate survival, proliferation and/or cellular differentiation.

Since the observation that c-Src interacts and is activated upon prolactin receptor stimulation, we are looking for the biological consequences of this event. Prolactin receptor stimulates Jak2 and Src tyrosine kinases. The Src activation is not required for Jak2 stimulation nor for tyrosine phosphorylation of the receptor. In turn, Jak2 does not play a role on prolactin stimulation of Src. Both events, emanating from the receptor activation are independent and at the same time essential for cell proliferation. Prolactin is implicated in the maturation of the Immune System, the receptor expression has been detected in very early B cells precursors, its expression increases up to mature B cells, where prolactin acts as a mitogen. In the mouse pro-B cell line BaF-3, upon transfection of the prolactin receptor, the cytokine induces the expression of B cell differentiation markers (I δ or IL-2Ra chain) as well as anti-apoptotic factors as bcl-2. Indeed, prolactin promoted significant expansions of defined B-lineage cell populations in short-term bone marrow cell cultures. These findings suggest that PRL, in collaboration with other cytokines and hormonal influences, modulates B cell development.

There are increasing evidences supporting a role for prolactin in breast cancer. In T47D human breast cancer cells, prolactin increases the phosphotyrosine content of proteins of the focal adhesion complexes, such as FAK and paxillin; these effects appear to be mediated by the Src family as they are abolished by specific inhibitors of these tyrosine kinases. The stimulation of the MAPK activity and the proliferation of the T47D cells induced by prolactin also seem to be controlled by the Src family. Together, the results suggest that these tyrosine kinases play a central role in the proliferative and cell morphology changes induced by prolactin in T47D breast cancer cells.

Having these data in mind, experiments seeking to further define and evaluate the role of the Src and Jak kinases and the cytokine receptor tyrosine phosphorylation on cell survival, proliferation and differentiation are ongoing in the laboratory.

Mesothelial cells obtained from peritoneal effluent. Its relationship with peritoneal antecedents and functional parameters

Group Leader: Francisco Vara

Anatomical and functional integrations of mesothelial cell (MC) are necessary to secure peritoneal stability. Omentum or peritoneal biopsies cannot be easily taken from the majority of peritoneal dialysis (PD) patients. The objective of this study is to show that MC taken from PD bags are able to grow in culture.

Fifty-two non-selected PD patients using dialysate containing glucose (2.27%) were studied. MC were obtained from bags of peritoneal nocturnal effluent. MC of 80.7% of patients showed appropriate proliferation in the culture flasks to reach the subconfluence state. After trypsinization, MC representation has been markedly increased, reaching the 95.5% of the total cells in the culture. The second seeding process in the multi-well plate shows that there is an exponential cell growth until day 16.

MC growth rate was inversely related to PD duration. Neither peritonitis incidence nor other demographic characteristics were related to MC growth degree. Creatinine and urea MTCs but not UF capacity were significantly related to MC growth rate. This growth is influenced by some of the intrinsic peritoneal characteristics derived from the peritoneal dialysis process. This tool is useful to evaluate individual peritoneal conditions and probably as a method for peritoneal viability follow-up, although further research is required.

6. Department of Regulation of Gene Expression

Regulation of gene expression by nuclear receptors in hippocampal and neuronal cells: interaction with other transcription factors and with mitogenic and neurotrophic factors

Group Leader: Ana Aranda

The aim of our work is to analyze the molecular mechanisms by which the nuclear receptors cooperate with other transcription factors, coactivators, and membrane receptors with tyrosine kinase activity to regulate the expression of different genes involved in proliferation and differentiation of pituitary and neuronal cells. We have identified response elements in the growth hormone, prolactin, *c-myc* or RAR β 2 genes which mediate transcriptional activation or repression by nuclear receptors and have analyzed the receptor domains involved in this regulation. We have also discovered a novel mechanism of nuclear receptor activation by interaction with the transcription factor Ets-1, and have defined mechanisms by which nuclear receptors modulate responses mediated by other signalling pathways

Function and control regulation of the paramyosin/miniparamyosin and Troponin T genes in *Drosophila*

Group leader: Margarita Cervera

Our main interest in the last two years has been centered in a) the study of the regulation of the expression of muscle genes, concretely the *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene (PM/mPM), as well as the troponin T gene (TnT) which represent a good model system in order to clarify such a regulation mechanism in *Drosophila* and probably in mammals, too. To characterize the mechanism(s) of transcriptional regulation of these genes during development, the *in vivo* analysis of the expression of the β -galactosidase gene under control of selected sequences in germ line transfectans of *D. melanogaster* has been studied. b) The identification and study of TnT mutations of the familial hyper trophic cardiomyopathies and its heart effects for the establishment of new diagnostic test for detect those mutations and also the establishment of correlations among mutations and phenotype. In paralell and as a second aim we propose the development of an animal model for study this disorder, concretely the use of the the indirect flight muscles of *Drosophila* because this muscles have similar characteristics than cardiac muscles.

Characterization of novel human genes and its possible involvement in inherited diseases.

Group Leader: Jesús Cruces

The activities of this group are focused in the field of Human Molecular Genetics, and our main interest is the characterization of novel human genes. Current studies deal with the analysis of the structure and function of:

The gene *POMT1*, encoding a Protein-O-mannosyl transferase which might be involved in early muscle system formation.

The tw (twisted) gene, the *Drosophila* ortholog of human *POMT2* gene, involved also in muscle system formation.

The *UHG62* gene, encoding a protein with unknown function containing a polyglutamine tract, and possibly implicated in neurodegenerative diseases.

The genes contained in the deleted region of the Williams-Beuren Syndrome, a complex alteration of development affecting the nervous system and cardiovascular apparatus, as well as connective tissues. We are also trying to develop a mouse model for the disease generating the same molecular defect as in humans.

Expression of mitochondrial genes and of the transcription factors involved in the biogenesis of mitochondria Tfam, NRF-1 and NRF-2, in rat liver, testis and brain

Group Leader: Carmen García Vallejo

Mitochondrial function requires genes encoded in both mitochondrial and nuclear genomes. Tfam, the activator of mammalian mitochondrial transcription, is encoded in the nucleus and its expression has been shown in *in vitro* studies to be controlled by nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2. In order to understand the physiological dependence of mitochondrial gene expression, we have analysed in rat liver, testis and brain the expression level of mitochondrial genes in parallel with those of the three transcription factors. We found that a) Tfam expression is down-regulated in rat testis, both at the protein and transcript level. The 3-fold reduction in the

abundance of Tfam protein in rat testis does not result in low steady-state levels of mitochondrial gene transcripts, suggesting that Tfam is in excess and does not limit transcription *in vivo*. b) NRF-1 and NRF-2 (α , β and γ subunits) mRNAs were analysed by Northern blotting; for each mRNA, several transcripts were observed as well as tissue-specific patterns of expression. The mRNA steady-state levels of NRF-1 and NRF-2 were higher in testis than in liver or brain. These data suggest that the low expression level of Tfam found in testis is not due to decreased NRF-1 and/or NRF-2 expression. c) The analysis of the protein levels of NRF-2 subunits indicated that there is no correlation between messenger and protein levels, further suggesting the existence of tissue-specific post-transcriptional regulatory mechanisms for the expression of NRF-1/NRF-2 genes. Similar observations were made with another key, nuclear-encoded mitochondrial protein, β subunit of ATP synthase complex. We are studying at present the regulation of these nuclear transcription factors in different physiological conditions.

Physiopathology of mitochondrial biogenesis

Group Leader: Rafael Garesse

Mitochondrial diseases comprise a group of disorders, usually degenerative in character and mainly affecting muscle and central nervous system, which are associated with mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA (nDNA). MtDNA exists as a semiautonomous genome encoding only a small subset of the function of the organelle, which are nevertheless critical to respiration. The rest, are encoded in the nucleus, and therefore the biogenesis of functional mitochondria depends on the co-ordinated expression of both genomes. We are studying mitochondrial biogenesis at two different levels: i) using as model system *Drosophila melanogaster* we are characterizing regulatory proteins involved in mitochondrial proliferation and differentiation, and modifying *in vivo* mitochondrial DNA replication. ii) Using the cybrid technology we are studying at molecular level the cellular effects of new mtDNA mutations responsible of human mitochondrial diseases and identifying the nuclear genes involved in syndromes of mtDNA depletion..

The Troponin component of *Drosophila* muscle. Genes and isoforms. Towards the establishment of a permanent *Drosophila* colony in Space.

Group Leader: Roberto Marco

We have started to characterize the properties of *Drosophila* troponin using the potent new techniques of mass spectrometry with the goal to identify more precisely the posttranslational modifications that occur in many of these isoforms. The project has been initiated on both troponin T and troponin H, a special high molecular weight tropomyosin isoform, which is believed to be exclusively expressed in the Indirect Flight Muscle. Troponin H is phosphorylated in threonines and we have already identified the modified residues in the sequence extension specific of these isoforms. At the same time, we have started studying the properties of *Drosophila* troponin C, the Ca binding troponin subunit, which in *Drosophila* is encoded by at least three different genes, clones of which are already available in our laboratory. We are

cloning the genes from related *Drosophila* species (*subobscura* and *virilis*) and we are raising antibodies to identify these components at the protein level. In relation to the Space program, the initiation of the assembly of the International Space Station has brought a certain reduction in the Space Biological Research activities. We are taking advantage of this slowing down to prepare the experiments that will be carried out in the ISS facilities, once they become available to the International Scientific Community. We are developing the hardware to grow and process the samples of *Drosophila* indefinitely cultured in Space. With this proposal, we would try to identify the genetic and phenotypic changes that a population of *Drosophila* may undergo in Space and the possible changes in the developmental mechanisms and/or in the aging process of this biological model system produced by this long-term exposure. It seems already amply verified that simple cell culture systems sense and respond to the changes in different Space environmental parameters such as the gravitational field. We are also optimizing certain techniques that may be difficult or dangerous to be performed in Space, For example, we are studying the microwave enhancement effects on fixation and on the bactericidal/sporicidal effects of certain chemical reagents with potential applications to Space and Ground Activities.

Regulation of expression of the β -Amiloid gene

Group Leader: Angel Pascual

β -amyloid protein is the major component of the senile plaques observed in the brains of humans with Alzheimer's disease. This 39-43 aminoacids peptide is a cleavage product of the different isoforms of the amyloid precursor protein APP, and an over-expression of this protein leads to a higher formation of the β -amyloid protein and is associated with neurotoxicity, thus contributing to the development of the pathology. Ligands of receptors with tyrosine kinase activity, as well as ligands of the nuclear receptor superfamily appear to regulate APP gene expression through yet unknown mechanisms. Using cultured cells of neural origin, we will analyze the molecular mechanisms by which these ligands regulate APP gene expression. Because most of these effects might be directly mediated throughout promoter elements, we will analyze the sequences involved in the regulation, as well as the contribution of the two AP-1 binding sites contained in the regulatory region of the gene.

Regulation of gene expression by nuclear receptors.

Group Leader: Ana Pérez Castillo

We have recently demonstrated that thyroid hormone is an important regulator of mitochondrial gene expression during brain development. In addition we have found that this effect, at least in part, seems to be mediated by the regulation of mitochondrial transcription factor Tfam. The promoter of this gene responds to T3 through an IR2 localized 600 bp upstream of the transcription initiation site. To gain further insights into the consequences of this regulation, we have performed functional analysis of brain mitochondria from control and hypothyroid neonatal rats. We have found that, in the hypothyroid cerebral cortex, striatum, and hippocampus, ATP synthesis is reduced by a 52, 59 and 31%, respectively, compared to control animals. The developing brain is a known target of T3 action, and many genes have been characterized so far

to be under T3 regulation. Among these we have found that CCAAT/enhancer binding protein beta gene expression is regulated by T3 in specific areas of the brain. This effect is due to a direct effect of T3 upon C/EBP β transcription since the promoter activity of this gene is induced by this hormone. Another gene whose expression is induced in the hyperthyroid brain is the transcription factor egr-1/NGFI-A. This gene, as well as C/EBP β , is involved in differentiation and cell death processes in neuroblastoma cells, processes in which T3 is also involved.

Regulation of gene expression in differentiation and development. Studies on the Serum Response Factor (SRF)

Group Leader: Leandro Sastre

Our studies on the regulation of gene expression during the embryonic development of the crustacean *Artemia franciscana* and during the differentiation of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* have been focused in the following topics: a) Function of the transcription factor SRF in the differentiation of the fruiting body of *D. discoideum* and in spore formation. b) Molecular cloning, developmental expression and functional studies of the *A. franciscana* SRF homologue. c) Identification of regulatory sequences on the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase promoter 2 from *A. franciscana*. d) Study of the nucleotide polymorphism of *A. franciscana* Na/K ATPase α 1 subunit gene.

7. Department of Cellular Signaling

Role of Akt/PKB kinase in neuronal survival.

Group Leader: Antonio Cuadrado

Akt/PKB kinase is one element of the kinase cascade PI3K/PDK1/PDK2/Akt, specifically related with cell survival. In our group we are analyzing the activation of this kinase by neurotrophins and oxidative stress in neural cells.

We have analyzed the inhibition of Akt by ceramide, a lipid second messenger involved in apoptosis signaling. We have reported the down-regulation of Akt by ceramide activated phosphatase in PC12 cells. Based on these results we have proposed a new mechanism for induction of apoptosis by ceramide based on the down-regulation of the Akt survival pathway. Moreover, we are also analyzing the possibility that activation of the Akt survival pathway might interfere with some elements of sphingomyelin metabolism.

Since oxidative stress appears to be the most likely cause of several neurodegenerative disorders we are studying the regulation of the PI3K/Akt pathway by reactive oxygen species and the potential role on cell viability of ectopically expressed hyperactive Akt versions. We have observed that PC12 cells overexpressing membrane anchored Akt by a myristylation tag are more resistant to cell death induced by MPP $^{+}$ (1-methyl-4-phenilpyridinium). This drug is a widely used as an inducer of experimental Parkinson disease in laboratory animals. At present we are

studying the mechanisms involved in this protection and its possible use for future *in vivo* studies.

Hepatic metabolism of carbohydrates: Diagnostic, physiopathological and regulatory aspects.

Group Leader: Juan E. Felú

Our work is mainly focused on the study of carbohydrate metabolism in liver, under the following aspects:

- 1) Biochemical and molecular diagnosis of glycogenoses, hereditary fructose intolerance and galactosemia.
- 2) Study of the molecular mechanisms underlying leptin- and TNF- α -dependent insulin resistance at the hepatic level.
- 3) Development of an animal model of hereditary fructose intolerance.

Molecular and cellular basis of malignant progression of squamous cell carcinomas

Group Leader: Miguel Quintanilla

Our laboratory is studying molecular and cellular events involved in malignant progression of squamous cell carcinomas by using the mouse skin model of carcinogenesis. We found that TGF- β_1 is a modulator of the epithelial phenotype of squamous carcinoma cells and induces, *in vitro* as well as *in vivo*, a squamous-spindle carcinoma transition associated with increased invasive and metastatic abilities. TGF- β_1 stimulates cell migration and invasiveness of transformed keratinocytes by activating pericellular proteolysis. Thus, the growth factor induces the expression / secretion of components of the plasminogen system, such as urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1. uPA was demonstrated to be functionally involved in TGF- β_1 -stimulated cell motility and invasiveness by using synthetic peptides antagonizing the binding of uPA to its cell-surface receptors. We have analyzed the transduction pathways that mediate the growth inhibitory and invasive responses of normal and transformed keratinocytes to TGF- β_1 . We have found that the growth factor rapidly and transiently activates both the Ras-MAP kinases and Smad pathways. TGF- β_1 utilizes one or another pathway to modulate the expression of specific genes or depending of the cellular state. Thus, upregulation of uPA by TGF- β_1 is mediated by the Ras-MEK-Erk pathway while upregulation of PAI-1 appears to be Smad-dependent. Furthermore, induction of the cell cycle inhibitor p21^{Cip1} is modulated by the Smad pathway in normal keratinocytes, while, in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene, p21^{Cip1} induction requires Ras-MAP kinase signaling. We also have found a cross-talk between the Ras and Smad pathways in Ras-transformed keratinocytes. The blockade of Smad4 (with a dominant-negative construct) in these cells constitutively hyperactivates the Ras-MAP kinase pathway leading to progression to poorly differentiated carcinomas. This effect was not observed in normal (immortalized) keratinocytes containing normal Ras genes This finding might be

clinically relevant in certain cancers where inactivation of the Smad4 tumor suppressor gene coincides with oncogenic Ras mutations, such as in pancreatic and colon carcinomas.

In addition to our studies with TGF- β_1 , we have identified and characterized the PA2.26 antigen as a novel mucin-type transmembrane sialoglycoprotein involved in cell migration and carcinogenesis. PA2.26 is induced in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts during carcinogenesis and skin remodeling processes, although it is present in normal tissues (brain, lung, kidney) in epithelial, mesothelial and endothelial cells. It is located on plasma membrane projections (microvilli, ruffles), where interacts with the actin cytoskeleton probably through association with the ezrin and radixin members of the ERM protein family. Transfection experiments in normal (immortalized) keratinocytes indicate that PA2.26 is functionally involved in cell motility and carcinogenesis.

Signaling pathways in stress, differentiation and apoptosis

Group Leader: Jaime Renart

Our group is studying signaling pathways in different cellular situations. 1. We are interested in the specific degradation of the R1 subunit of the NMDA glutamate receptor when cells (both rat cortical neurons in culture or mammalian non-neuronal cells expressing the receptor with a vaccinia virus system) are treated with drugs that induce endoplasmic reticulum stress (tunicamycin, calcium ionophores, brefeldin or tapsigargin). We find a proteasome-dependent specific degradation of R1 subunit (vs. R2A subunit) with some but not all these compounds. 2. We are carrying structural studies of NMDA receptors (expressed with vaccinia virus in a non-neuronal cell line) with respect to a) differential stability of the different subunits; b) degree of glycosylation; c) presence in the plasma membrane; d) role as calcium channels, and e) activity of homomeric R2A receptors. We are also producing recombinant vaccinia viruses that overexpress the different subunits of the NMDA receptors to determine the structure of these proteins. 3. We are studying the roles of ERK and JNK protein kinases in apoptosis induced by PKC inhibition in N2A cells. We find that JNK is activated and ERK inhibited when apoptosis is induced. 4. We are also studying MAPK profiles in differentiating cells (either by serum deprivation, overexpression of MEKK1 or Geldanamycin treatment). ERK activity is continuously activated during the process; JNK is also activated, but its kinetics is dependent on the stimulus used to differentiate the cells. 5. We are studying the effect of Geldanamycin in different cell lines. Whereas this drug induces apoptosis in PC12 cells, N2A cells differentiate, and C2C12 cells undergo morphological changes not related to differentiation or death. 6. We are studying gene expression induced by TNF α . This cytokine has been described to be involved both in induction and protection from apoptosis. To get a more clear picture of TNF α action, we want to identify the genes that are regulated by it. To this goal, we are using the Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) technique.

Molecular bases of the thyroid hormone action on differentiation of nerve cells

Group Leader: M. Angeles Rodríguez-Peña

Myelination of axons in the Central Nervous System (CNS) is a process controlled by thyroid hormone (T3). We have reported previously that thyroid hormone regulates the steady-state levels of the mRNAs encoding the major myelin protein components and that this effect is due to the T3 action on the oligodendrocyte generation. Thus, T3 promotes the differentiation of the oligodendrocyte precursor cells (OLP) into mature oligodendrocytes "in vitro". Thyroid hormone binds specific nuclear receptors (encoded by the *a* and *b* genes) that must be considered as ligand-regulated transcription factors. To establish the bases for the T3 action on the different aspects involved in oligodendrocyte differentiation program, we have studied 1) the contribution of T3 to the exit from the cell cycle of the OLP as the obligatory step prior differentiation and have found that thyroid hormone expression impairs cell proliferation by increasing the steady-state levels of the inhibitor p27. 2) The genetic program (activation/repression of a group of genes) in the precursor cell triggered by T3 has been analyzed by DDRT-PCR with several putative regulated genes that will be confirmed and characterized.

Diffusible factors and signalling pathways implicated in the control of the inner ear development: regulation of apoptotic cell death.

Group Leader: Isabel Varela

The main objective of the group is to characterise the diffusible factors and molecular mechanisms of action that regulate the early development of the inner ear. This study is focused in the study of programmed cell death. This project is divided in three particular objectives: 1) Study of the role of IGF-I in the developing inner ear, 2) Study of NGF apoptotic actions: the inner ear as a model of neurotrophic factors-induced apoptosis, 3) Crosstalk between IGF-I and NGF signalling pathways. All these studies will offer new insights into the molecular mechanisms that control cell proliferation and apoptosis during inner ear organogenesis which may contribute to the development of future therapeutical strategies for inner ear therapy.