

## **MEMORIA 1994-95**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C.**

**y**

**Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.M.**

**Arturo Duperier 4**

**E-28029 Madrid**

**Tel: 585-4600**

**FAX: 585-458**

**Internet: <http://www.iib.uam.es>**

## INDICE

	<b>página</b>
<b>1. Presentación</b>	<b>5</b>
<b>2. Organigrama del Instituto</b>	<b>7</b>
<b>3. Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer</b>	<b>13</b>
<b>4. Departamento de Biología Molecular y Celular de la Transducción de Señales</b>	<b>33</b>
<b>5. Departamento de Bioquímica y Genética de Levaduras</b>	<b>55</b>
<b>6. Departamento de Endocrinología Molecular</b>	<b>69</b>
<b>7. Departamento de Enzimología y Patología Molecular</b>	<b>93</b>
<b>8. Departamento de Regulación de la Expresión Génica</b>	<b>113</b>
<b>9. Departamento de Regulación Hormonal</b>	<b>137</b>
<b>10. Seminarios celebrados</b>	<b>153</b>
<b>11. Cursos impartidos</b>	<b>163</b>
<b>12. Índice alfabético de investigadores</b>	<b>167</b>
<b>13. Índice de palabras claves</b>	<b>171</b>
<b>14. Summary of research topics</b>	<b>175</b>

## Presentación

Esta memoria recoge la actividad científica de los investigadores que integran el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) del CSIC y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UAM durante el bienio 1994-1995. Ambos centros vienen manteniendo tradicionalmente una estrecha colaboración y todos sus integrantes participan conjuntamente en la marcha y organización del centro. Recientemente el CSIC ha concedido al IIB la consideración de "Centro propio del CSIC en el que se integra personal de otras Entidades", lo que permite la incorporación de los miembros del Departamento de Bioquímica en el Claustro científico del IIB y su participación en los órganos de gobierno de este centro. Esta integración esperamos que sea un primer paso para la creación en el futuro de un Centro Mixto entre ambas instituciones. Como puede deducirse de los resúmenes de las líneas de trabajo de los diferentes grupos de investigación, la actividad científica desarrollada en el centro cubre un amplio rango de temas básicos de biomedicina y biología celular y molecular. Dicha actividad científica ha dado lugar durante este bienio a un gran número de publicaciones, la mayoría en revistas internacionales de calidad según los índices internacionales de impacto, lo que convierte a este centro en una institución de referencia nacional en este campo que puede compararse con otras instituciones similares extranjeras de reconocido prestigio. Esperamos que las condiciones en el futuro favorezcan un progresivo aumento tanto del número como de la calidad de estas publicaciones. Durante el bienio 1994-1995 se han recibido diversas ayudas de infraestructura tanto del Plan Nacional como de la DGICYT y de la Comunidad de Madrid que han permitido una gran mejora en el equipamiento del centro. Asimismo, la captación de recursos en convocatorias de proyectos de agencias nacionales e internacionales ha ascendido a 372 millones de pesetas en el año 1994 y a 422 millones en 1995. Es de destacar el aumento de la participación de investigadores del centro en proyectos financiados por la Unión Europea y el reconocimiento que supone la ayuda institucional concedida al centro por este organismo internacional para acoger becarios post-doctorales. En el reverso de la moneda se encuentran las deficiencias de espacio y personal que afectan negativamente a los grupos de trabajo. Las primeras esperamos que sean subsanadas con la construcción de un edificio para la ampliación del IIB que ya ha sido aprobada. En cuanto a las segundas, a pesar del impacto positivo que ha supuesto para diversos grupos la incorporación de doctores por el programa de contratos de reincorporación, el pequeño número de becas predoctorales disponibles así como el déficit crónico de personal de apoyo no permite un tamaño y composición adecuada para una máxima producción científica. Durante este bienio es de destacar la firma de sendos convenios con el "Instituto de Biología y Genética Molecular" de la Universidad de Valladolid y con el "Grupo de Biomembranas del Departamento de Bioquímica" de la Universidad del País Vasco que les concede la consideración de "Unidad Asociada" al CSIC a través del IIB. Confiamos en que la formación de dichas Unidades permita consolidar y ampliar las relaciones científicas entre los grupos de investigación del Instituto y de las otras instituciones. Todos los miembros de este centro hemos vivido con profundo pesar la enfermedad y muerte de nuestro compañero Luis Lamas. Su entusiasmo y su actitud positiva ante los problemas debe servirnos de ejemplo y ayudarnos en el desarrollo de nuestra vida científica y personal.

Ana Aranda Iriarte

Directora

## **Organigrama del Instituto**

**Directora:** Ana Aranda  
**Vicedirector:** Leandro Sastre  
**Gerente:** Rafael Alguacil

## **Departamentos de Investigación:**

### **1. Biología Molecular y Celular del Cáncer**

Jefe de Departamento:  
Miguel Quintanilla (1994)  
Rosario Perona (1995)

Investigadores:  
Amparo Cano  
Angel Pestaña  
Rosario Perona  
Miguel Quintanilla  
Antonio Villalobo

Personal de Apoyo a la Investigación:  
Amparo Jiménez  
Amalia Montes

### **2. Biología Molecular y Celular de la Transducción de Señales**

Jefe de Departamento:  
Jorge Martín (1994)  
Sebastián Cerdán (1995)

Investigadores:  
Susana Alemany  
Sebastián Cerdán  
Margarita Fernández  
José G. Castaño  
José María Mato  
Jorge Martin  
Francisco Vara

Personal de Apoyo a la Investigación:  
Carmen Domínguez  
Joaquín Oliva  
Francisco Jesús Garrido Pérez

### **3. Bioquímica y Genética de Levaduras**

Jefe de Departamento:  
Rosario Lagunas (1994)  
Pilar Eraso (1995)

Investigadores:  
Pilar Eraso  
Carlos Gancedo  
Rosario Lagunas  
María Jesús Mazón  
Francisco Portillo  
Juana María Sempere

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

#### **4. Endocrinología Molecular**

Jefe de Departamento:  
Juan Bernal

Investigadores:  
Juan Bernal  
Francisco Escobar del Rey  
Gabriela Morreale de Escobar  
Alberto Muñoz  
María Jesús Obregón  
Angeles Rodríguez Peña

Personal de Apoyo a la Investigación:  
Gloria Chacón  
Socorro Durán  
Arturo Hernández  
Margarita González  
María Jesús Presas

#### **5. Enzimología y Patología Molecular**

Jefe de Departamento:  
María Antonia Günther (1994)  
Juan J. Aragón (1995)

Investigadores:  
Juan José Aragón  
Antonio Coloma  
Juan Emilio Felú  
Claudio Fernández de Heredia  
Gertrudis de la Fuente

María Antonia Günther  
Pilar Llorente  
Rosa Sagarra  
Antonio Sillero  
Eulalio Zaera

Personal de Apoyo a la Investigación:

Luisa Argomániz  
Elena Candel  
Isabel de Diego  
María Asunción Navarro  
Valentina Sánchez  
Ana M. Seguido (1995)

## **6. Regulación de la expresión génica**

Jefe de Departamento:

Leandro Sastre

Investigadores:

Margarita Cervera  
Jesús Cruces  
Carmen G. Vallejo  
Rafael Garesse  
Roberto Marco  
Ana M<sup>a</sup> Pérez-Castillo  
Jaime Renart  
Leandro Sastre

Personal de Apoyo a la Investigación:

Carmen Moratilla  
Pilar Ochoa  
Ana M. Seguido (1994)

## **7. Regulación Hormonal**

Jefe de Departamento:

Pilar Santisteban

Investigadores:

Ana Aranda  
Trinidad Jolin  
Juan Carlos Lacal  
Luis Lamas († 1994)  
Angel Pascual

Personal de Apoyo a la Investigación:

M. Angeles Ramos  
Aida Villa (hasta Diciembre 1994)  
Carmen Luengo (desde Diciembre 1994)

## **Servicios de Gestión y Administración**

Responsable:  
Rafael Alguacil

Administración:  
Rafael Alguacil  
Rosa Monteserín  
Jesús Rodríguez  
M<sup>a</sup> Carmen Moreno  
Manuela Mingot

Almacén:  
Mariano Garrido  
Javier Laforga

Biblioteca:  
M<sup>a</sup> Paz Langa

Correspondencia:  
Eustaquio Vaquero

Secretaría de Dirección:  
Renée Clarys

Recepción y telefonía:  
Juana de la Rosa  
Gabriel Barón

## **Servicios Técnicos:**

Responsable:  
Roberto López

Animalario:  
Fernando Nuñez  
Pablo Señor

Cultivo de Células y Preparación de medios:  
Ana Gutierrez (desde 1994)  
M<sup>a</sup> Carmen Luengo (hasta Diciembre 1994)  
Antonio Jiménez-Escrig

Dibujo y Delineación:  
Javier Pérez

Fotografía:  
Antonio Fernández  
Elena Fraga (1994)

Ricardo Uña Marín (1995)

Informática:

Javier Puche (1994)

Javier Merino (1995)

Lavado de Material:

Silvia Cuena

Manuela Rodríguez

Mantenimiento:

Roberto López

Angel García

Ramón Navares

Rafael Vara

Radioprotección:

María Teresa Macías

Raquel Piña

Secuenciación:

Gemma R.Tarduchi

**Departamento de Biología Molecular y  
Celular del Cancer**

## **Implicación de las cadherinas E y P en la progresión tumoral. Regulación de su expresión y función.**

Investigadora principal:	Amparo Cano, Profesora Titular UAM
Becaria postdoctoral:	Marisa M. Faraldo (hasta Octubre 1994)
Becarios predoctorales:	Encarnación Lozano Isabel Rodrigo Jesús Espada
Personal de apoyo:	Amalia Montes
Colaboradores:	Miguel Quintanilla, IIB Carlos Gamallo, José Palacios, Natividad Benito, Angel Pizarro. Dpto. Anatomía Patológica. Hospital La Paz. Madrid. Angels Fabra, Ana Llorens, Lluís López-Barcons, Milagro González-Garrigues. Instituto de Recerca Oncològica Hospital Duran Reynals. Barcelona. Allan Balmain, Chistopher Kemp. CRC Department of Medical Oncology. Beatson Laboratories. Glasgow. U.K.

Nuestros estudios sobre la implicación de dos miembros de la familia de cadherinas "clásicas", cadherina E (CDE) y cadherina P (CDP), en la progresión tumoral se dirigen en gran parte a profundizar en los mecanismos moleculares y celulares que controlan la expresión y actividad funcional de estas moléculas durante la progresión, así como a delimitar su implicación en el proceso de invasión y metástasis. Estos estudios toman como base el modelo experimental de la carcinogénesis química de piel de ratón que permite analizar estadios definidos de la progresión tumoral, tanto en tumores inducidos in vivo (papilomas, carcinomas epidermoides, carcinomas fusiformes) como en líneas celulares representativas de diferentes estadios. Por otra parte, nuestros estudios sobre la expresión de ambas moléculas en carcinomas humanos mamarios y basocelulares de diferentes tipos histológicos se dirigen fundamentalmente a evaluar la utilidad diagnóstica/pronóstica de la CDE y/o CDP.

### **Regulación de la expresión de CDE y CDP durante la progresión en la carcinogénesis de piel de ratón.**

(M.L.M. Faraldo, I. Rodrigo, A. Montes, A. Cano)

Nuestros estudios previos sobre la expresión de CDE y CDP en la carcinogénesis de piel de ratón mostraron la pérdida de CDE durante la progresión de carcinomas epidermoides y la pérdida total de CDE y CDP en carcinomas indiferenciados fusiformes. Para profundizar en los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de ambas moléculas se está llevando a cabo un estudio exhaustivo de las regiones promotoras y reguladoras de los genes de CDE y CDP. Los estudios de expresión transitoria realizados con varias construcciones del promotor de la CDP (aislado en nuestro grupo por la Dra. Faraldo) en diferentes líneas de queratinocitos (con niveles variables de expresión de CDP) han puesto de manifiesto la implicación de dos elementos 5' proximales: región rica en GC (-80 a -110) y caja CCAAT (-

65) en el control de la transcripción específica de tipo celular. Mediante estudios de interacción de factores nucleares se ha podido caracterizar la participación prioritaria de factores de la familia Sp1 en el reconocimiento de la región rica en GC y de factores relacionados con la familia CP1 en la caja CCAAT. Además, se ha identificado la existencia de elementos reguladores de la expresión de CDP en el primer intrón del gen, y concretamente un sitio AP1, con un papel importante en la pérdida de expresión observada en células indiferenciadas derivadas de carcinomas fusiformes. Estudios similares con el promotor de la CDE (cedido por J. Behrens, Max-Delbruck Center, Berlín) han puesto de manifiesto la participación negativa del elemento palindrómico, E-pal, (-76 a -88) en la expresión específica de tipo celular de la CDE en este sistema, ya que este elemento ejerce un papel represor en células deficientes en la expresión de CDE derivadas de carcinomas fusiformes (ej. CarB) y, en menor medida, de carcinomas epidermoides (ej. HaCa4). Por otra parte, la región rica en GC (-25 a -58) y la caja CCAAT (-65) del promotor de CDE parecen ejercer un papel positivo en la actividad transcripcional. Se ha caracterizado la participación mayoritaria de factores de la familia AP2 en el reconocimiento región rica en GC y de factores de la familia CP1 y/o C/EBP en el reconocimiento de la caja CCAAT, aunque no se han observado diferencias significativas en el reconocimiento de ambas regiones entre líneas de queratinocitos que expresan y no expresan CDE. Sin embargo, si se han observado diferencias significativas entre ambos tipos celulares en el reconocimiento de una región localizada 5' al elemento E-pal que contiene entre otros un elemento Ets. Nuestros esfuerzos actuales se centran en caracterizar los factores responsables del reconocimiento de estas regiones (Ets y elemento E-pal), sus posibles interacciones y su influencia en la transcripción del gen de CDE en queratinocitos normales y transformados.

Dentro de esta línea de investigación, recientemente hemos iniciado otras colaboraciones con el fin de analizar la influencia de la sobre expresión de factores de transcripción de la familia *slug/snail* (con la Dra. A. Nieto, Instituto Cajal, Madrid) y del gen E1A (con el Dr. S. Ramón y Cajal, Hospital Puerta de Hierro, Madrid) en la expresión de CDE y CDP.

### **Modulación de la actividad funcional de CDE en la progresión tumoral. Papel de plakoglobina y $\alpha$ -catenina.**

(E. Lozano, J. Espada, A. Cano)

La actividad funcional de las cadherinas 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, cateninas, de las que se han identificado hasta la fecha cuatro componentes:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -catenina (plakoglobina) y pp120. Nuestros estudios en la carcinogénesis de piel de ratón se centran en el análisis de los complejos CDE-cateninas en las diferentes líneas celulares de queratinocitos y su posible modulación por factores exógenos. Una parte de estos estudios se ha centrado en el componente  $\gamma$ -catenina/plakoglobina, ausente en células indiferenciadas derivadas de carcinomas fusiformes. Mediante transfección estable de la línea fusiforme CarB se derivaron una serie de clones que expresan plakoglobina y CDE. La plakoglobina exógena es capaz de interactuar con CDE y los demás componentes en complejos funcionalmente activos en ensayos de agregación celular. No obstante, los clones CDE+/plakoglobina+ mantienen un fenotipo fibroblastoide similar al de las células parentales, no habiéndose podido inducir una transición fibroblasto-epitelio por la presencia de complejos CDE-cateninas activos. Estas observaciones, junto al análisis de la estabilidad de los complejos mediante estudios de solubilidad en detergentes y microscopía confocal, nos llevan a sugerir que la mera presencia de complejos CDE-cateninas asociados al citoesqueleto de actina no es suficiente para

inducir/mantener el fenotipo epitelial mediado por CDE, sino que se requiere la presencia de otros componentes epiteliales (ej. desmosomas, filamentos intermedios de queratinas) ausentes en las células indiferenciadas como CarB. El papel de  $\alpha$ -catenina y su posible modulación por el oncogén Ha-ras se está analizando en varias líneas de queratinocitos con diferentes niveles de Ha-ras oncogénico, derivadas de diferentes tumores u obtenidas por transfección estable de queratinocitos inmortalizados con vectores de expresión de Ha-ras normal y oncogénico. Así mismo, y en colaboración con la Dra. V. Braga (MRC, Londres), se ha iniciado el análisis de la modificación de los complejos CDE-cateninas por fosforilación en las diferentes líneas de queratinocitos.

### **Papel de la CDE en la invasión y la metástasis y su relación con el oncogén Ha-ras.**

(I. Rodrigo, C. Caulín, A. Llorens, E. Lozano, A. Montes, Ll. López, M. Garrigues, M. Quintanilla, A. Fabra, A. Cano)

Nuestros estudios previos sobre las propiedades invasivas y metastásicas de la línea celular HaCa4 (CDE-) y una serie de clones obtenidos tras la transfección con el cDNA de CDE (E24, E62) mostraron que la expresión de CDE es suficiente para impedir el proceso de invasión sobre matrices artificiales, pero no es suficiente para bloquear el proceso metastásico *in vivo*, indicando un papel importante de la dosis de Ha-ras oncogénico en este proceso. Para profundizar en el papel de ambas moléculas en los procesos de invasión y metástasis se procedió a bloquear la expresión de CDE en el clon E24 (no invasivo ni metastásico, con bajos niveles de Ha-ras) mediante la transfección estable de un vector con cDNA antisentido de CDE. El estudio de estos clones ha permitido demostrar de forma concluyente el papel anti-invasivo de CDE en este sistema y su estrecha relación con una metaloproteasa específica, colagenasa IVB o MMP-9. La ausencia de CDE induce la expresión de MMP-9, mientras que la expresión de otras metaloproteasas (MMP-2, MMP-3, transina) o sus inhibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP3) es independiente de CDE en este sistema. Estos datos apoyan fuertemente que en la carcinogénesis de piel de ratón el papel anti-invasivo de CDE está mediado por la represión de la gelatinasa MMP-9, aparentemente independiente de la dosis de Ha-ras. No obstante, altas dosis del oncogén Ha-ras parecen disparar el proceso metastásico *in vivo* por otros mecanismos, aparentemente independientes de la expresión de CDE y MMP-9.

### **Influencia del gen supresor p53 en la expresión de CDE, CDP e integrinas en la progresión maligna.**

(C. Gamallo, C. Kemp, N. Benito, J. Palacios, M. Quintanilla, A. Balmain, A. Cano)

La progresión maligna de papiloma a carcinoma epidermoide es un evento relativamente poco frecuente en la carcinogénesis de piel de ratón (5-10% según la cepa de ratón y el protocolo específico de inducción-promoción) siendo el estadio donde la inactivación del gen supresor p53 ocurre más frecuentemente. Con el fin de caracterizar marcadores tempranos de progresión maligna, se ha realizado un estudio de la expresión de CDE, CDP y otros marcadores tempranos propuestos (integrina  $\alpha 6\beta 4$ , queratina K13) en una colección de papilomas derivados de ratones deficientes en los dos alelos del gen p53 y de ratones control (heterocigotos y salvajes para p53), ya que los primeros exhiben una mucha mayor frecuencia de conversión a carcinomas (50%) que los segundos (5-8%). Se ha detectado la existencia de alteraciones significativas en la expresión de CDE (pérdida parcial) y en menor medida de

CDP en los papilomas derivados de ratones p53<sup>-/-</sup> respecto a los controles, mientras que no se han observado cambios significativos en la expresión de  $\alpha6\beta4$  y K13 entre los dos grupos de papilomas. Estos datos indican que las alteraciones en CDE ocurren en estadios tempranos de la progresión maligna, pudiendo ayudar a discriminar tumores con diferente capacidad de progresión en este sistema. Por otra parte, sugieren que la expresión de p53 puede estar implicada de forma directa o indirecta en la expresión/función de CDE.

### **Expresión de CDE y CDP en carcinomas de mama y basocelulares humanos.**

(N. Benito, J. Palacios, A. Pizarro, C. Gamallo, A. Cano)

El análisis de la expresión de CDE y CDP en una amplia colección de carcinomas de mama de diferente tipo histológico y grado de diferenciación nos ha llevado a caracterizar la expresión anómala de CDP en un subtipo de carcinomas ductales poco diferenciados, pero de difícil clasificación actual, lo que puede introducir un nuevo factor diagnóstico para este subtipo específico de tumores. Por otra parte, el estudio de la expresión de CDE conjunto al de otros marcadores utilizados habitualmente (receptores de estrógenos y progesterona, p53, c-erbB2, etc.) en esta colección de tumores ha puesto de manifiesto la existencia de correlación entre la pérdida de expresión de CDE y mutaciones en p53 por un lado, y alteraciones en el receptor de progesterona, por otro. Actualmente, se está procediendo al análisis molecular (mediante RT-PCR, SSCP) de tumores ductales y lobulillares que mostraron pérdida de expresión de CDE con el fin de caracterizar la presencia de posibles mutaciones en el gen de CDE.

La expresión de CDE y CDP se ha analizado, asimismo, en carcinomas basocelulares de diferente tipo histológico (algunos con gran agresividad local y muy escasa incidencia metastásica, como los infiltrativos) detectándose la existencia de patrones específicos de expresión de las dos moléculas en función del tipo histológico y grado de diferenciación. No obstante, y en contra de lo observado en carcinomas de mama, hasta la fecha no se ha detectado ningún caso de carcinoma basocelular con pérdida total de expresión de CDE. Otra característica relevante observada, es el hecho de que la CDP se encuentra significativamente sobreexpresada en la piel adyacente a los carcinomas basocelulares. Nuestro interés actual se centra en el posible carácter pronóstico de la CDP en lesiones cutáneas con potencial desarrollo de carcinomas basocelulares.

### **Publicaciones.**

Pizarro, A., Benito, N., Navarro, P., Palacios, J., Cano, A., Quintanilla, M., Contreras, F. and Gamallo, C. (1994). E-cadherin expression in basal cell carcinomas. *Br. J. Cancer.* 69: 157-162 .

Cano, A. (1994). Cadherinas: moléculas de adhesión célula-célula dependientes de calcio implicadas en morfogénesis embrionaria e invasión tumoral. *Bio-Reguladores*, 3: 45-54.

Cano, A., Gómez, M., Navarro, P., Caulín, C., Gamallo, C. and Quintanilla, M. (1994) Modelos experimentales de cáncer: Utilidad en el estudio de marcadores de diferenciación celular en la progresión tumoral. En "Investigación sobre cáncer en España: de la Biología Molecular a la Clínica" (G. Capellá, M. Hernández Bronchud, F. Lluís, Eds), pp. 41-54. Monografías Dr. Antonio Esteve. Barcelona.

Gómez, M. and Cano, A. (1995). Expression of  $\beta 1$  integrin receptors in transformed mouse epidermal keratinocytes: upregulation of  $\alpha 5\beta 1$  in spindle carcinoma cells. *Mol. Carcinog.* 12: 153-165 .

Gómez, M., Navarro, P. and Cano, A. (1995). Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: Increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotype. *Invasion and Metastasis*, 14: 17-26.

Palacios, J., Benito, N., Pizarro, A., Suárez, A., Espada, J., Cano, A. and Gamallo, C. (1995). Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Amer. J. Pathol.*, 146: 605-612.

Pizarro, A., Gamallo, C., Benito, N., Palacios, J., Quintanilla, M., Cano, A. and Contreras, F. (1995). Differential patterns of placental and epithelial cadherin expression in basal cell carcinoma and in the epidermis overlying tumours. *Br. J. Cancer*, 72: 327-332.

Palacios, J., Benito, N., Berraquero, R., Pizarro, A., Cano, A. and Gamallo, C. (1995). Differential expression of E- and P-cadherin during mouse tooth development. *Int. J. Dev. Biol.*, 39: 663-666.

**Palabras clave.**

Adhesión celular, cadherinas, cateninas, factores de transcripción, progresión tumoral, invasión y metástasis, metaloproteasas, carcinogénesis piel, carcinoma mamario.

## **Papel del pH intracelular en la transformación tumoral y en la respuesta a estrés celular**

Investigadora principal: Rosario Perona Abellón. Colaborador Científico.

Becarios predoctorales: Lourdes Gómez García  
Javier Guerra Gómez  
Isabel Sánchez Perez  
Luisa Saniger Bernal

El gen *PMA-1* codifica por una protón ATPasa de levadura. Cuando este gen se expresa en células de ratón induce un aumento del pH intracelular y transformación tumoral. Utilizando este sistema, como modelo de modificación del pH intracelular hemos encontrado que la expresión de este gen produce un aumento en los niveles de los complejos AP-1, los cuales están formados por los factores de transcripción fos y jun. El aumento en la transcripción del gen *c-fos* se lleva a cabo mediante la activación del elemento de respuesta a suero del promotor por una vía independiente de MAP-2 quinasa. Por otro lado la activación del promotor del gen *c-jun* se produce principalmente a través de los sitios JUN1 y JUN 2 del promotor. La activación se produce por una vía independiente de la proteína quinasa C y por otra parte hemos determinado que se induce la activación transcripcional de la proteína, sin modificar la capacidad de unión a DNA.

La exposición de la células a luz ultravioleta, citoquinas y varios factores de crecimiento induce la activación transcripcional del factor *jun/ATF-2*. La activación de ambas proteínas se produce mediante la fosforilación del dominio N-terminal por los enzimas JNK y p38 respectivamente para *c-jun* y *ATF-2*. Nosotros hemos encontrado que la activación transcripcional de *c-jun* inducida por EGF, TNF- $\alpha$  y luz UV se bloquea por inhibidores del intercambiador sodio-protón (NHE). La expresión del gen *PMA-1* también induce la transcripción de *c-jun* de forma independiente del NHE. Por otra parte la activación de JNK producida por los estímulos antes mencionados también se afecta negativamente por inhibidores del NHE. Actualmente estamos estudiando cual de los enzimas involucrados en la cascada de activación de JNK es la afectada por cambios en el pH intracelular.

### **Publicaciones**

Peterson, E.P., Martinez, G., Martinez, R., Perona, R. and Gillies, R. (1994) "NIH3T3 cells transfected with a yeast H<sup>+</sup>-ATPase have altered sensitivity to insulin, insulin growth factor-1 and platelet-derived growth factor AA" *J. Cell. Physiology*. 159 (3), 551-560

J.R. Murguía, L. DeVries, L. Gomez-García . A. Schönthal and R. Perona (1995) Expression of an heterologous proton pump induces transactivación of the *c-fos* promoter. *J. Cell Biochem*. 57, 630-640

Jimenez, B., Esteve, P., Perona, R., Arends, M., Wyllie, A., Sanchez, R., Ramón y Cajal, S., and Lacal, J.C. (1995) Induction of apoptosis in NIH3T3 cells by rho-p21. A GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* 10, 811-816

Montaner, S., Ramos, A., Perona, R., Esteve, P., Carnero, A. and Lacal, J.C. (1995). Overexpression of PKC $\zeta$  in NIH3T3 cells does not induce cell transformation nor

tumorigenicity and does not alter NFκB activity. *Oncogene*, 10, 2213-2220.

**Palabras clave**

Oncogenes, proliferación, estrés, pH interno, apoptosis, transcripción.

## **Citogenética molecular de tumores del sistema nervioso**

Investigador responsable:	Angel Pestaña, Investigador Científico
Investigadores asociados:	Juan A Rey , Prof. Ayudante del Dpto. Bioquímica (hasta sept. 1994) Maria José Bello: Investigadora contratada, CSIC Fundación Areces (hasta Oct. 1995) Javier Saez- Castresana: Investigador contratado, MEC (1993)
Colaboradores externos:	J. Vaquero, Servicio de Neurocirugía de la Clínica Puerta de Hierro. JL Sarasa y M Barnácer, de los Servicios de Oncología Pediátrica y Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz. P García-Miquel, A Queizán , JL Hernández-Moneo y A. Gamallo, de los Servicios de Oncología Pediátrica, Cirugía Infantil, Neurocirugía y Anatomía Patológica, Hospital La Paz.JM de Campos y ME Kusak, Servicio de Neurocirugía, H. del Rio Ortega, Valladolid
Becaria predoctoral:	Paola Leone: Beca "Mutis" del Instituto de Cooperación Iberoamericana (1993)
Ayudantes	Paloma Nebreda (contratada del FIS) Marcia Pestaña (contratada PNI+D)

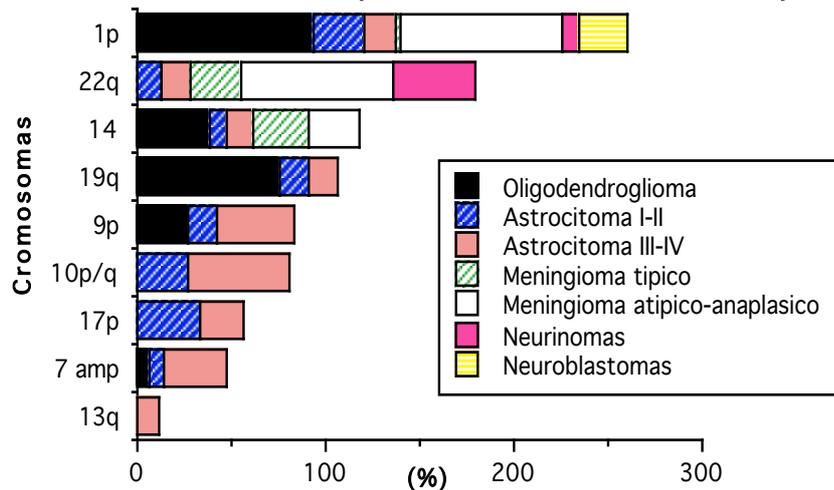
El grupo de trabajo sobre Citogenética Molecular del Cancer en el Instituto de Investigaciones Biomédicas se ha ido formando a partir de 1988, con la incorporación de los Dres. JA Rey y MJ Bello y J Saez-VCastresana y las colaboraciones establecidas con los Servicios de Neurocirugía y Anatomía Patológica de la Fundación Jimenez Díaz, Hospital de la Princesa, Clínica Puerta de Hierro, a las que se ha incorporado el grupo de Oncología Pediátrica, Cirugía Infantil y Anatomía Patológica del Hospital La Paz. Gracias a estas colaboraciones hospitalarias se ha logrado establecer un banco de tumores del sistema nervioso formado por cerca de 500 muestras tumorales y sangre de los pacientes, así como su ADN de alto peso molecular que estan siendo estudiadas con técnicas citogenéticas y de genética molecular con ayudas del Plan Nacional (SAF 92/0182 y 95/0898), FIS (92/0783 y 95/0524) y CAM (367/92). Con independencia de estas actividades, el investigador responsable dispone de una ayuda del PNI+D (INF 95-1315E) para la creación de una base de datos de la producción científica española en biociencias con fines de evaluación institucional.

El objetivo final de la actividad del grupo es la caracterización de alteraciones genéticas de carácter diagnóstico y pronóstico - mediante el establecimiento de correlaciones clínico analíticas - y en la identificación y mapeo de locus oncosupresores específicos de tumores del sistema nervioso.

### **Resumen de actividades :**

La complejidad de las alteraciones genéticas y citogenéticas observadas en los tumores nerviosos sugiere la existencia de distintos loci oncosupresores que pueden estar relacionados con tipo tisular (astrocitos / oligodendroglía) y con la progresión a formas progresivamente malignas (astrocitomas grados I a IV). Con objeto de contribuir a la identificación de estos hipotéticos loci oncosupresores hemos efectuado un mapeo exhaustivo de delección (RFLP) en los cromosomas 1, 9, 10, 14, 17, 19 y 22, en ADN procedente de distintos tipos de tumores del SN. que se resume en la figura adjunta

### Alteraciones cromosómicas mas frecuentes en los tumores del SN (resumen de 200 muestras)



Las principales conclusiones de este estudio son:

- El brazo corto del cromosoma 1 (1p) y el brazo largo del 22 (22q) acumulan buena parte de las alteraciones citogenéticas y moleculares observadas en los tumores del SN, seguido de 22q.
- Las alteraciones de 1p se encuentran preferentemente en neuroblastomas, meningiomas y tumores de tipo oligodendroglial.
- En meningiomas son frecuentes las asociaciones de 22q, 1p y 14, mientras que los neurinomas parecen reducidos a alteraciones en 22q, con una participación minoritaria en 1p
- En oligodendrogliomas, las asociaciones más frecuentes son las de 1p, 14 y 19q
- Los astrocitomas presentan una variada panoplia de alteraciones que abarca los 9 cromosomas estudiados.

### Publicaciones

Bello MJ, Vaquero J, De Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestaña A, Rey, JA. (1994) Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int. J. Cancer*: 57, 172-175.

Bello MJ, De Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestaña A, Rey, JA. (1994) Molecular and cytogenetic analysis of chromosome 9 deletions in 75 malignant gliomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 9: 33-41.

Bello MJ, De Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey, JA. (1994) Ascertainment of chromosome 7 gains in malignant gliomas by cytogenetic and RFLP analyses. *Cancer Genet Cytogenet*, 72: 55-58.

Saez-Castresana J, Bello, MJ, Rey JA, Nebreda P, Queizan A, García-Miguel P, Pestaña A. (1994) No deletion of TP53 mutations in neuroblastoma by PCR-SSCP analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 9:296-298.

Bello MJ, De Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey, JA. (1994) Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 73: 122-129.

Bello MJ, De Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey, JA. (1994) Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 9: 296-298.

A. Pestaña (1994) Life class. *Nature* 371, 194

Bello MJ, Leone PE, Nebreda P, Kusak E, De Campos JM, Vaquero j, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA (1995) Molecular abnormalities of chromosome 19 in malignant gliomas: Preferential involvement of the 19q13.2-q13.4 region *Int. J. Oncology* 6: 655-658.

Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, De Campos JM, Kusak, ME, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA (1995) Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int. J. Cancer*, 64: 207-210.

Gómez L, Barrios C, Kreicbergs A, Zetterberg A, Pestaña A, Saez-Castresana J (1995) Absence of mutation at the GAP- related domain of the Neurofibromatosis type 1 gene in sporadic neurofibrosarcomas and other bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 81: 173-174.

Saez-Castresana J, Gómez L, Palacios J, Gamallo C, García-Miguel P, Queizan A, Pestaña A. (1995) The status of p53 expression and NF1-GRD mutation in neuroblastoma. *Int. J. Oncology* 7: 755-757.

Bello MJ, Leone PE, Nebreda P, De Campos JM, Kusak E, Vaquero j, Sarasa JL, García-Miguel P, Queizán A, Hernández-Moneo JL, Pestaña A, Rey JA (1995) Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genetics Cytogenetics* 83(2): 160-164

Queizán A, García-Miguel P, Castresana JS, Bello MJ, Rey JA, Pestaña A (1995) Neuroblastoma suprarrenal con transposición completa del segmento infrarrenal de la vena cava inferior. A propósito de un caso. *Revista Española de Pediatría*, 51: 95-98

Gómez L, Barrios C, Kreicbergs A, Zetterberg A, Pestaña A, Saez-Castresana J (1995) Absence of mutation at the GAP- related domain of the Neurofibromatosis type 1 gene in sporadic neurofibrosarcomas and other bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 81: 173-174

A. Pestaña (1995) Presencia del CSIC en el Segundo Programa Marco. *Mundo Científico*, 155: 224-231.

A. Pestaña, I. Gómez, MT Fernández, MA Zulueta, A. Méndez (1995) Scientometric evaluation of R&D activities in medium-size institutions: A case study based on the Spanish

Scientific Research Council (CSIC). Proceedings of the Fifth Biennial Conference of the International Society for Scientometrics and Informetrics . Chicago , pp 425-434. Learned Information Inc, Medford, NJ.

A.Pestaña (1995) Spanish Science. Nature 375: 626.

## **Progresión maligna en la carcinogénesis de piel de ratón**

Investigador principal: Miguel Quintanilla, Colaborador Científico

Becarios predoctorales: Carlos Caulín  
Francisco G. Scholl  
Pilar Frontelo

Colaboradores: Amparo Cano, IIB-F. Medicina UAM, Madrid  
Senén Vilaró, Univ. de Barcelona  
Carlos Gamallo, Hptal La Paz, Madrid  
Angels Fabra, IRO, Barcelona  
Santiago Ramón y Cajal, Clín. Puerta de Hierro, Madrid  
Jorge Martínez, INTA-Univ. Chile, Santiago (Chile)

Nuestro laboratorio está estudiando alteraciones de la adhesión celular y del citoesqueleto asociadas a la progresión maligna, utilizando, fundamentalmente, el modelo experimental de la carcinogénesis de piel de ratón. En particular, en estos años se ha puesto un énfasis especial en el estudio de la transición carcinoma epidermoide-carcinoma fusiforme, la última etapa de la progresión maligna, en la que las células tumorales pierden completamente el carácter epitelial y adquieren características mesenquimáticas, al mismo tiempo que aumentan su potencial invasivo y metastático.

### **Identificación de antígenos tumorales inducidos en la progresión maligna mediante la producción de anticuerpos monoclonales.**

(F.G. Scholl, P. Frontelo, A. Gandarillas, C. Gamallo, S. Vilaró y M. Quintanilla)

Se ha continuado con la caracterización de los antígenos inducidos en células de epidermis durante la transformación neoplásica, reconocidos por anticuerpos monoclonales que fueron generados en nuestro laboratorio contra una línea celular con un fenotipo tumoral de carcinoma bien diferenciado. Se han seleccionado, finalmente, tres anticuerpos monoclonales: PC2.27, que tiene la particularidad de reaccionar con células humanas; este anticuerpo reconoce una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto presente en carcinomas que podría utilizarse como marcador pronóstico en el cáncer de mama; PC2.17, que reconoce una proteína asociada con los microfilamentos de actina y parece señalar en células de epidermis transformadas una reorganización del citoesqueleto de actina más flexible, similar a los microfilamentos de fibroblastos, probablemente reflejando un fenotipo migratorio; y PA2.26, que reconoce una O-sialoglicoproteína de membrana plasmática localizada en microvilli y ondulaciones de la membrana plasmática (ruffles), también (como PC2.17) presente en fibroblastos normales, seguramente implicada en la migración celular.

### **El factor TGFbeta como modulador del fenotipo epitelial en células de carcinoma. Implicaciones en la invasión y la metástasis.**

(P. Frontelo, C. Caulín, F.G. Scholl, J.F. Santibáñez, J. Martínez y M. Quintanilla)

Los estudios sobre el efecto de TGFbeta1 en la diferenciación de células de epidermis

normales y transformadas han revelado que este factor induce una transdiferenciación epitelial-mesenquimática en células de carcinomas bien diferenciados, tanto in vitro como in vivo. Este efecto parece ser específico para células transformadas que escapan a la inhibición de la proliferación que ejerce el factor sobre células normales o derivadas de papilomas benignos. Estos resultados nos han llevado a postular que TGFbeta1 es el factor responsable de la transición carcinoma epidermoide-carcinoma fusiforme que ocurre in vivo en la carcinogénesis de piel de ratón. Experimentos preliminares indican que las células tratadas con TGFbeta que adquieren un fenotipo epitelioide, en el que co-expresan queratinas y vimentina y sintetizan niveles reducidos de cadherinas y de componentes desmosómicos, aumentan su potencial metastático. Por otro lado TGFbeta1 induce la expresión y secreción de uroquinasa (u-PA), un activador de metaloproteasas implicadas en la metástasis, y al mismo un inductor de la migración de diferentes tipos celulares.

### **Papel de cadherina E en la capacidad metastásica de células de carcinoma. Correlación entre el potencial metastásico y la expresión del oncogén H-ras.**

(C. Caulín, A. Cano, A. Fabra y M. Quintanilla)

Hemos estudiado el papel del receptor de adhesión intercelular cadherina E en la capacidad metastática de células de carcinoma utilizando un modelo in vitro compuesto por una línea celular de carcinoma que reprimió la expresión de cadherina E y por clones transfectantes en los que se introdujo el cDNA que codifica para esta proteína. Los resultados de este estudio revelan que la capacidad metastática de las células, ensayada in vivo en ratones atímicos, es independiente de la expresión de cadherina E. Sin embargo, la pérdida del potencial metastático correlacionó con una disminución de la expresión del mRNA y p21 H-ras oncogénica. Asimismo, la expresión anómala de la queratina embrionaria y de epitelios simples K8 (un marcador tardío de la progresión maligna en carcinomas epidermoides) mostró una buena correlación con la capacidad metastática. La expresión de cadherina E mostró una perfecta correlación con la capacidad de las células para migrar a través de matrices de colágeno IV en ensayos in vitro. Este hecho parece estar relacionado con el bloqueo de la expresión génica de la colagenasa MMP-9 en células cadherina E (+), como han puesto de manifiesto experimentos en los que se bloqueó la expresión de cadherina E con oligonucleótidos antisentido. Estos resultados sugieren que cadherina E puede jugar un papel determinante en las primeras etapas del proceso invasivo, mientras que el fenotipo metastático es un fenotipo complejo en el que intervienen numerosos factores genéticos y epigenéticos.

### **Evaluación de la expresión de cadherinas como marcador de progresión en carcinomas**

(C. Gamallo, A. Pizarro, M. Quintanilla y A. Cano)

Hemos estudiado la expresión de cadherinas E y P, mediante inmunohistoquímica, en muestras de carcinomas de piel de pacientes del Hptal La Paz. Los resultados de este estudio sugieren que la expresión de cadherina E es un buen marcador pronóstico en el carcinoma basal, ya que su expresión estaba significativamente reducida en carcinomas basales infiltrativos, mientras que la expresión de cadherina P se encontraba preservada. Estos datos están de acuerdo con otros estudios anteriores en cáncer de mama y con nuestras observaciones en el modelo experimental de piel de ratón. A este respecto, un nuevo estudio realizado en colaboración con el grupo del Dr. A. Balmain (Beatson Inst. for Cancer Research, Glasgow, Escocia) en el que se evaluó la expresión de las cadherinas E y P, la

integrina  $\alpha 6\beta 4$  y la queratina K13 en papilomas benignos inducidos en ratones "knock-out" para los alelos del gen p53 (un modelo genético que presenta un alto riesgo de progresión maligna) muestra la existencia de cambios dinámicos en la expresión de cadherinas e integrinas y sugiere que la caída en la expresión de cadherina E es un marcador temprano de la progresión de papilomas a carcinomas.

### **Efecto de la expresión del gen E1A de adenovirus en la diferenciación de células de carcinoma y en la sensibilidad a quimioterapia y radioterapia.**

(R. Sánchez-Prieto, M. Quintanilla, A. Cano y S. Ramón y Cajal)

La proteína E1A de adenovirus induce múltiples alteraciones celulares debido a su capacidad de unirse a distintas proteínas nucleares. Para analizar si la expresión de E1A puede ser utilizada como un agente terapéutico para el tratamiento de carcinomas, hemos iniciado un estudio en líneas celulares derivadas de carcinomas de piel de ratón y de carcinomas humanos, transfectadas o infectadas con vectores que contienen la región 13S E1A, para evaluar su sensibilidad a quimioterapia y radioterapia. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que las líneas que expresan E1A son 4-10 veces más sensibles a cisplatino y radiación gamma, independientemente del status de la proteína p53 y de otras alteraciones genéticas (ras). Por otro lado, la expresión de E1A altera el estado de diferenciación celular y enlentece el crecimiento de los tumores inducidos por la inyección de las células en ratones atómicos.

### **Publicaciones**

Pizarro, A., Benito, N., Navarro, P., Palacios, J., Cano, A., Quintanilla, M. y Gamallo, C. (1994). Expresión de cadherina E en el epiteloma basocelular: Correlación con el patrón de crecimiento y la invasividad local. *Actas Dermosifiliogr.* 85: 1-10.

Pizarro, A., Benito, N., Navarro, P., Palacios, J., Cano, A., Quintanilla, M., Contreras, F. and Gamallo, C. (1994). E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 69: 157-162.

Cano, A., Gómez, M., Navarro, P., Caulín, C., Gamallo, C. y Quintanilla, M. (1994). Modelos experimentales de cáncer: Utilidad en el estudio de marcadores de diferenciación celular en la progresión tumoral. En "Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular clínica" (Capellá, G., Hernández-Bronchud, M. y Lluís, F., Eds) pp 41-53. Fundación Dr. Antonio Esteve Monografía nº 15, Barcelona, España.

Pizarro, A., Gamallo, C., Benito, N., Palacios, J., Quintanilla, M., Cano, A. and Contreras, F. (1995). Differential patterns of placental and epithelial cadherin expression in basal cell carcinoma and in the epidermis overlying tumors. *Br. J. Cancer* 72: 327-332.

Caulín, C., Scholl, F.G., Frontelo, P., Gamallo, C. and Quintanilla, M. (1995). Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to Transforming Growth Factor- $\beta 1$  induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth & Differ.* 6: 1027-1035.

**Tesis**

Carlos Caulín Moreno. Alteraciones de la diferenciación epitelial durante la progresión maligna en la carcinogénesis de piel de ratón. Director: Miguel Quintanilla. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. 1994.

**Palabras clave**

Epidermis, carcinogénesis, diferenciación, TGFbeta, cadherina, queratina, H-ras, invasión, metástasis, anticuerpo monoclonal

## **Comunicación intercelular en células normales y tumorales**

Investigador principal: Antonio Villalobo, Investigador Científico.

Profesores/Investigadores visitantes:

Gustavo Benaim (1994) Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela.  
Hans-J. Gabius (1994) Ludwig-Maximilians-Universität, München Alemania.  
W. Howard Evans (1994) University of Wales, Cardiff, Wales, Reino Unido.  
Lech Wojtczak (1994) Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw Polonia.  
Carlos Enrich (1994) Universitat de Barcelona, Barcelona.

Becarios y estudiantes visitantes: Sabine André (1994) Ludwig-Maximilians-Universität, München Alemania.  
Heike S. Behn (1994) Hannover Universität, Hannover Alemania.  
Maite Martínez Pastor (1994) Universidad de Valencia, Valencia.  
Irene Pelayo (1994-1995) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.  
Meylín Sujú (1995) Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela.

Postdoctoral contratado: José Martín Nieto (1994-1995)

Becarios predoctorales: Ana Elexpuru Artetxe (1994)  
Maribel Elvira Guijarro (1994)  
Juan Antonio Díez Iriondo (1994)  
Octavio Hernández Perera (1994)  
Trinidad De Frutos Herranz (1994-1995)  
Rosa María García-Nieto Hernaiz (1994-1995)  
José Antonio Horcajadas Almansa (1994-1995)

Personal de apoyo: Amparo Jiménez Martínez (1994-1995)  
Carmen Gómez (1994-1995)

La actividad de nuestro grupo se centra en el estudio de diversos sistemas celulares de comunicación intercelular y su regulación, así como de las alteraciones de dichos sistemas en células tumorales.

### **Regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por óxido nítrico**

(C. Estrada, C. Gómez, T. De Frutos, y A. Villalobo)

El óxido nítrico es un biorregulador que inhibe la proliferación de diversos tipos de células. Hemos demostrado que la inhibición del crecimiento celular también tiene lugar en fibroblastos que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

usando diversos donadores de óxido nítrico, y que dicha inhibición no está mediada por la activación de la guanilato ciclasa, uno de los mecanismos clásicos de acción del óxido nítrico. Por otro lado, hemos puesto en evidencia que el óxido nítrico inhibe la transfosforilación del EGFR y su actividad tirosina quinasa hacia sustratos exógenos sin afectar la capacidad de unir a su ligando. El óxido nítrico parece actuar directamente sobre el EGFR reaccionando con grupos sulfhidrilos y formando un receptor S-nitrosilado, ya que la inhibición de la actividad del EGFR se revierte parcialmente mediante el uso de agentes reductores.

### **Regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por el par calmodulina/fosfocalmodulina**

(J. Martín Nieto, T. De Frutos, O. Hernández-Perera, M. Martínez-Pastor, A. Elexpuru, M. Sujú, G. Benaim, y A. Villalobo)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico es una tirosina quinasa transmembrana que transduce la señal proliferativa de diversos ligandos. Nuestro grupo ha puesto en evidencia hace algún tiempo que la calmodulina interacciona con el EGFR modulando su actividad. Entre estas evidencias destacan: i) La calmodulina se fosforila por el EGFR con alta estequiometría en su residuo Tyr-99 y en ausencia de calcio, ii) La calmodulina no-fosforilada inhibe la transfosforilación del EGFR y su actividad tirosina quinasa hacia sustratos exógenos en presencia de calcio, y iii) La fosfocalmodulina parece ejercer una acción estimuladora sobre la transfosforilación del receptor y sobre su actividad tirosina quinasa. Así, la señal transitoria del calcio generada durante la activación mitogénica de las células podría ser mediada a través de los mecanismos arriba mencionados. Estos estudios se han llevado a cabo gracias a dos métodos desarrollados en nuestro laboratorio. Por un lado, el aislamiento del EGFR mediante cromatografía de afinidad en columnas de calmodulina-agarosa y, por otro, permeabilizando células que sobreexpresan el EGFR para realizar estudios *in situ*. Más recientemente, hemos identificado que el sitio de unión de la calmodulina al EGFR se encuentra localizado en la región citoplásmica yuxtamembranal del receptor y hemos estudiado las propiedades de dicha unión usando una proteína de fusión entre la glutatión S-transferasa y un polipéptido correspondiente al sitio de unión de la calmodulina del EGFR humano. En el sitio de unión de la calmodulina también se encuentra localizado un sitio de fosforilación por la proteína quinasa C, que también ejerce una función reguladora, por lo que estamos estudiando las posibles relaciones entre ambos mecanismos reguladores negativos del EGFR.

### **Adenililación de proteínas de la membrana plasmática de células normales y tumorales**

(R. M. García-Nieto, J. Martín Nieto, y A. Villalobo)

La adenililación de proteínas puede ser debida a la formación de un intermediario catalítico en algunos enzimas o a un proceso postransduccional con función presumiblemente reguladora. Nuestro grupo ha puesto de manifiesto la existencia de un proceso de adenililación de cuatro proteínas (gp130, gp120, gp110 y gp100) de la membrana plasmática de hígado normal de rata. Hemos también demostrado que existe una menor adenililación de tres proteínas (gp125, gp115 y gp105) de la membrana plasmática de células del hepatocarcinoma de rata AS-30D, que presumiblemente son análogas a las de hígado normal. Recientemente, hemos purificado a partir de hígado normal dos de las proteínas adenililables (gp120 y gp110) mediante cromatografías de afinidad utilizando ATP o AMP inmovilizado. Estas dos proteínas forman

dímeros unidos por puentes disulfuro y sus posibles actividades enzimáticas se encuentran en estudio.

### **Producción del factor de crecimiento transformante $\beta$ por células tumorales**

(A. Elexpuru, y A. Villalobo)

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ejerce en muchos tipos celulares una acción inhibitoria sobre la proliferación celular. Hemos demostrado que las células tumorales ascíticas de Ehrlich producen TGF $\beta$ , y que dicho factor no ejerce acción inhibitoria sobre la proliferación de dichas células, ya que éstas no expresan receptores para dicho factor. La falta de expresión de receptores para el TGF $\beta$  en éstas células es probablemente uno de los factores que contribuyen a su alta e incontrolada velocidad de proliferación.

### **Regulación de las uniones intercelulares comunicantes**

(J. A. Horcajadas, M. Elvira, J. A. Díez, J. Martín Nieto, y A. Villalobo)

Las uniones intercelulares comunicantes están formadas por canales intercelulares formados por conexinas que median el paso de iones, metabolitos y segundos mensajeros entre células adyacentes. Entre los mecanismos reguladores implicados en el control de la apertura/cierre y ensamblaje/desensamblaje de dichos canales está la fosforilación de las conexinas. En este contexto, hemos puesto en evidencia que la fosforilación de la conexina-32 por la proteína quinasa C evita su degradación por calpaínas. Por otro lado, hemos demostrado que la tirosina quinasa intrínseca del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fosforila a la conexina-32. Se han preparado diversas proteínas de fusión entre la glutatión S-transferasa y diversos segmentos de la conexina-32 con dos objetivos principales: i) Estudiar los sitios de fosforilación de la conexina-32 por el EGFR, y ii) Estudiar el papel de dos residuos de prolina de la conexina-32 en el mecanismo protector contra la proteólisis por calpaínas mediado por la fosforilación de la conexina-32 por proteína quinasa C.

### **Publicaciones**

Díez, J. A., and Villalobo, A. (1994) Reconstitution of rat liver gap junctions in liposomes. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 373S.

Khan, M.T., Wang, K.K.W., Villalobo, A., and Roufogalis, B.D. (1994) Characterization of a novel high molecular mass protein with peptidase activity purified from the human erythrocyte membrane by calmodulin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 269, 10016-10021.

Elexpuru, A., Soriano, M., and Villalobo, A. (1994) Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor from Ehrlich ascites tumor cells. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 293-298.

Elvira, M., Wang, K.K.W., and Villalobo, A. (1994) Phosphorylated and non-phosphorylated connexin-32 molecules in gap junction plaques are protected against calpain proteolysis after protein kinase C-phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 793-796.

Benguría, A., Hernández-Perera, O., Martínez-Pastor, M. T., Sacks, D. B., and Villalobo, A. (1994) Phosphorylation of calmodulin by the epidermal-growth-factor-receptor tyrosine kinase. *Eur. J. Biochem.* 224, 909-916.

Zeng, F.-Y., Benguría, A., Kafert, S., André, S., Gabius, H.-J., and Villalobo, A. (1995) Differential response of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity to several plant and mammalian lectins. *Mol. Cell. Biochem.* 142, 117-124.

Benguría, A., Martín-Nieto, J., Benaim, G., and Villalobo, A. (1995) Regulatory interaction between calmodulin and the epidermal growth factor receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 472-476.

Díez, J.A., Elvira, M., and Villalobo, A. (1995) Phosphorylation of connexin-32 by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 477-480.

Benguría, A., Soriano, M., Joyal, J., Sacks, D.B., and Villalobo, A. (1995) Phosphorylation of calmodulin by plasma-membrane-associated protein kinase(s). *Eur. J. Biochem.* 234, 50-58.

### **Tesis Doctorales**

Ana Elexpuru Artetxe. “Características proliferativas de las células tumorales ascíticas de Ehrlich”. Director: Antonio Villalobo. Universidad Autónoma de Madrid (1994).

M<sup>a</sup> Isabel Elvira Guijarro. “Proteólisis de la conexina-32 por calpaína y su regulación”. Director: Antonio Villalobo. Universidad Autónoma de Madrid (1994).

Juan Antonio Díez Iriondo. “Fosforilación de la conexina-32 por el receptor del factor de crecimiento epidérmico”. Director: Antonio Villalobo. Universidad Autónoma de Madrid (1994).

### **Tesis de Licenciatura**

Trinidad De Frutos Herranz. “Fosforilación de la calmodulina por el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano en células permeabilizadas”. Director: Antonio Villalobo. Universidad Autónoma de Madrid (1995).

### **Palabras clave**

Adenilación de proteínas, Calcio, Calmodulina, Canales intercelulares, Células tumorales, Conexinas, Fosfocalmodulina, Receptor del factor de crecimiento epidérmico, Receptores del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , Tirosina quinasas, Uniones intercelulares comunicantes.

**Departamento de Biología Molecular y Celular  
de la Transducción de señales.**

## **Mecanismo de activación de linfocitos T: Estudio de la est quinasa, AdoMet sintetasa y AdoMet decarboxilasa.**

Investigadora principal:	Susana Alemany. Colaboradora Científica
Becario posdoctoral:	Victor Calvo
Becarios predoctorales:	Carlos Lisbona Rafael Tobeña. Alicia Ballester
Personal de apoyo:	Carmen Campos

## **Papel de las proteínas quinasas PKC; RAF-1 y ERK-2 en la activación y proliferación de linfocitos T (en colaboración con Marga Fernández-Renart).**

## **Regulación de la expresión de la AdoMet sintetasa y AdoMet decarboxilasa en linfocitos T.**

## **Regulación de la secreción de interleuquina-2 en linfocitos T por la est quinasa.**

### **Publicaciones**

García, I. Pipaón, C., Alemany, S. y Pérez-Castillo, A. 1994. Induction of NGFI-B gene expression during T cell activation. *J.Immunol.*153.3417.

Lisbona, C. Alemany, S., Calvo, C., and Fernández-Renart., M 1994. Raf-1 and Erk2 kinases are required for phorbol 12,13-dibutyrate-stimulated proliferation of rat lymphoblasts. Erk2 activation precedes Raf-1 hyperphosphorylation. *Eur.J.Immunol.*24: 2746

García, I, Moreno, J. Martín-Duce, A. Campos, C. and S. Alemany 1995  $\beta$ -endorphin in immunosuppression and analgesia. *Pain.*12: 6

### **Tesis doctorales**

Inmaculada García (1995) Expresión de los genes NGFI-A y NGFI-B en el ciclo celular de linfocitos T. Regulación por  $\beta$ -endorfina. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Directora: Susana Alemany

Carlos Lisbona (1995) Papel de las proteínas quinasas PKC; RAF-1 y ERK-2 en la activación y proliferación de linfocitos T. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (Directoras: Susana Alemany y Margarita Fernández-Renart).

### **Palabras clave**

Est quinasa, cot quinasa, interleuquina-2, AdoMet sintetasa, AdoMet decarboxilasa, linfocitos T.

## **Resonancia Magnética en Medicina y Biología.**

Investigadores:	Sebastián Cerdán García-Esteller, Colaborador Científico Paloma Ballesteros García, Catedrática de Universidad, Departamento de Química Orgánica y Biología, Universidad Nacional Educación a Distancia
Investigador asociado:	Emilio López Beltrán, Investigador contratado C.S.I.C. (desde Diciembre 1994)
Investigadores visitantes:	Christa Seipelt, Abteilung Physikalische Chemie, R.W.T. H., Aachen, Alemania (1994). Peter Klüner, Abteilung Physikalische Chemie, R.W.T.H., Aachen, Alemania (1994). Ana García Pérez, Departamento Bioquímica, Universidad Alcalá de Henares (1995).
Colaboradores externos:	José M. Roda, Fernando Carceller y José María Pascual, Servicio Neurocirugía, Hospital La Paz
Becarios predoctorales:	Milagros Moldes (1990- Abril 1994) Francisco Chapa (1990-Junio 1994) Fátima Cruz Fernández-Castañeda (1991-Junio 1995) Paula Zaderenko (1992-1996) Pilar López Larrubia (1995-1998) Beatriz de Mateo Silleras (1994) Maria Jesús Maté (1994) Ricardo Scott Barrio (1995)
Personal de apoyo:	Sonia Ortiz (1995)

### **Estructura y función del agua en sistemas biológicos.**

(E. López Beltrán, M.J. Maté, A. García y S. Cerdán)

Estamos estudiando el transporte, metabolismo y estructura del agua en diversos sistemas biológicos. Nuestro abordaje se basa en la determinación de los tiempos de correlación rotacional y de las constantes de difusión translacional del agua mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN. Esta metodología permite determinar, en un rango  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  s los tiempos de residencia medios del agua en células y orgánulos subcelulares, así como caracterizar las viscosidades aparentes de los diversos microentornos celulares. Los resultados indican que el agua permanece aproximadamente  $10^{-2}$  s en hepatocitos y menos de  $10^{-4}$  s en las mitocondrias. La viscosidad aparente del citosol es aproximadamente dos veces la del agua destilada y en la mitocondria es quince veces superior al citosol.

### **Abordajes cuantitativos del metabolismo cerebral.**

(F. Cruz, R. Scott y S. Cerdán, en colaboración con M. Villalba y J. Satrústegui, Universidad Autónoma de Madrid y Anna Planas, C.S.I.C. Barcelona)

Hemos estudiado cuantitativamente el metabolismo de glucosa en neuronas y astrocitos en cultivo primario para determinar sus analogías y diferencias con el metabolismo de los compartimentos neuronal y glial en el cerebro intacto. Aunque el consumo de glucosa en neuronas y astrocitos es similar al del cerebro intacto, tanto las neuronas como los astrocitos metabolizan más del 50% de la glucosa consumida a través de la glucólisis anaerobia. Esta situación es muy diferente a la observada en el cerebro intacto, que metaboliza más del 95% de su glucosa a través de la respiración. Los resultados sugieren importantes diferencias en la regulación de la respiración entre las preparaciones de células en cultivo y el cerebro intacto. También hemos demostrado que la compartimentación metabólica cerebral en el metabolismo de (1,2- $^{13}\text{C}_2$ ) acetato se manifiesta durante la mielinización y presenta diferentes características en diversas regiones anatómicas del cerebro.

### **Regulación hormonal del metabolismo cerebral.**

(F. Chapa y S. Cerdán, en colaboración con B. Künnecke, Biozentrum der Universität Basel y F. Escobar del Rey y G. Morreale de Escobar, IIB, C.S. I.C. Madrid)

Se han estudiado las alteraciones en el metabolismo cerebral inducidas por el hipotiroidismo inducido en el estado adulto utilizando  $^{13}\text{C}$  RMN. La deficiencia de hormona tiroidea induce alteraciones importantes en (i) los consumos relativos de glucosa y acetato por los compartimentos neuronal y glial y en (ii) los intercambios relativos de glutamato, glutamina y GABA entre estos dos compartimentos.

### **Resonancia Magnética en Patología cerebral.**

(J.M. Roda, F. Carceller, J.M. Pascual en colaboración con S. Cerdán)

Hemos caracterizado por  $^{13}\text{C}$  RMN las alteraciones que induce la isquemia cerebral focal (ICF) en los compartimentos neuronal y glial del hemisferio isquémico y del contralateral. Después de una hora de ICF, el hemisferio isquémico presenta un incremento en la transferencia de glutamato y GABA neuronales al compartimento glial y un ligero descenso en la transferencia de glutamina del compartimento glial al neuronal. También ha sido posible establecer los patrones espectrales de  $^1\text{H}$  RMN de 80 biopsias de tumores cerebrales humanos. Un algoritmo de reconocimiento de patrones basado en el análisis de redes neuronales permite reconocer automáticamente, los espectros de gliomas y meningiomas, entre otros.

### **Nuevos reactivos para el diagnóstico mediante espectroscopía (MRS) e imagen (MRI) por Resonancia Magnética.**

(P. Zaderenko, P. López, C. Seipelt, P. Klüner, S. Cerdán y P. Ballesteros)

Se ha sintetizado una nueva serie de sondas moleculares para la medida no invasiva del

pH intra y extracelular por  $^1\text{H}$  RMN. También hemos generado una nueva serie de complexonas solubles que podrían resultar de utilidad como agentes de contraste MRI acoplados a  $\text{Gd}^{3+}$ . En todos los casos, hemos completado la síntesis con un estudio extenso sobre la reactividad química de estos compuestos y sobre los procedimientos más apropiados para obtener imágenes de desplazamiento químico tanto en solución como sobre muestras biológicas. Finalmente estamos investigando la posibilidad de utilizar la dinámica molecular como una nueva herramienta para la predicción de propiedades farmacológicas de diversos tipos de moléculas neuroactivas.

## Publicaciones

M. Moldes, S. Cerdán, P. Erhard y J. Seelig (1994)  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  exchange in the perfused rat liver metabolizing (3- $^{13}\text{C}$ ) alanine and  $^2\text{H}_2\text{O}$  as detected by multinuclear NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 7, 249-262.

M.S. Gil, P. Zaderenko, F. Cruz, S. Cerdán y P. Ballesteros (1994). Imidazol-1-yl alkanolic acids as extrinsic probes for the determination of intracellular pH, extracellular pH and cell volume. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2, 305-314.

P. Zaderenko, M. S. Gil, P. Ballesteros y S. Cerdán (1994) Synthesis and regioselective hydrolysis of 2-imidazol-1-ylsuccinic esters. *Journal of Organic Chemistry* (1994) 59, 6268-6273.

F. Chapa, F. Cruz, M. Moldes, P. Gruhlke, B. de Mateo, M.J. Maté y S. Cerdán (1994)  $^{13}\text{C}$  NMR detected spin coupling patterns and isotopic shifts as novel metabolic tools. *Quarterly of Magnetic Resonance in Biology and Medicine*, 2, 107-116.

Günther Sillero, M.A., de Diego, A., Cerdán, S., Criel, G. y Sillero, A (1994). Occurrence of millimolar concentrations of guanosine (5') tetraphospho (5') guanosine (GP4G) in encysted embryos of *Thamnocephalus platyurus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B, 1, 41-45.

Szwergold, B.S., Kappler, F., Moldes, M., Shaller, C. y Brown, T (1994) Characterization of a Phosphonium Analog of choline as a probe in  $^{31}\text{P}$  NMR studies of phospholipid metabolism. *NMR in Biomedicine*, 7, 121-7.

F. Chapa, B. Künnecke, R. Calvo, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar y S. Cerdán (1995) Cerebral metabolism of (1,2- $^{13}\text{C}_2$ ) acetate in adult hypothyroid rats. *Endocrinology* 136, 296-305.

M. Moldes, F. Cruz, F. Chapa y S. Cerdán (1995). The perfused mouse liver as a model system for the study of intracellular pH homeostasis. *Quarterly of Magnetic Resonance in Biology and Medicine*, 2, 5-17.

P. Grhülke, C. Seipelt, A. Dölle, P. Zeitler, P. Zaderenko, P. Ballesteros y S. Cerdán. (1995) Molecular dynamics of barbiturates and hydantoin as a basis for their pharmacological activity. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions II* 1215-1219.

Ballesteros, P., López, C., López, C., Claramunt, R.M., Jimenez, J.A., Cano, M., Heras, J.V., Pinilla, E. y Monge, A. (1994) 2,5-Norbornane Rhodium (I) Complexes with bis and Tris (azol-1-yl)methanes. *Organometallics* (1994) 13, 289-297.

López, M.C., Claramunt, R.M. y Ballesteros, P. (1994) Synthesis of new bis (indazol-1-yl) phenylmethanes. *Heterocycles* 37, 891-896.

López, M.C., Jagerovic, N. y Ballesteros, P. (1994) Regioselective synthesis of the homochiral ligand (4S,7R) - 7,8,8 - Trimethyl - 4,5,6,7 - tetrahydro - 4,7-methanoindazol - 2 - yl-indazol-1'-ylmethane. *Tetrahedron: Asymmetry* 5, 1887-1890.

Zaderenko, P., López, P., Ballesteros, P., Takumi, H. y Toda, F. (1995) Resolution of 2-azoly succinic esters by enantioselective inclusion methodology. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6, 381-384.

### **Patentes**

Ballesteros, P., López, P. y Cerdán, S. (1995) Complexonas de naturaleza de ácidos N-2 - (azol-1(2)-il)etilamino diacéticos. Síntesis, estudio analítico y aplicaciones biológicas. Patente P9501185 U.N.E.D.-C.S.I.C.

### **Tesis doctorales**

Milagros Moldes Rodríguez (1994) Metabolismo del agua deuterada en hígado de roedores detectada por Resonancia Magnética Multinuclear. Director: S. Cerdán. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares.

Francisco Chapa Gabriel (1994) Compartimentación metabólica en el cerebro de rata adulta detectada por Resonancia Magnética de carbono-13. Directores: S. Cerdán y P. Ballesteros. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid.

Fátima Cruz Fernández-Castañeda (1995) Metabolismo intermediario de Neuronas, Astrocitos y sinaptosomas detectado por Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13. Director: S. Cerdán. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares. 1995.

### **Tesis de Licenciatura**

Beatriz de Mateo Silleras (1994) El ácido imidazol acético y su metil ester como nuevas sondas para la determinación del pH intracelular y del volumen celular por  $^1\text{H}$  RMN. Director: S. Cerdán. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid.

Maria Jesús Maté Pérez (1994) Estudio por espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN de la dinámica molecular del agua en suspensiones de mitocondrias aisladas. Director: S. Cerdán. Facultad de Ciencias Físicas. Universidad de Valladolid.

Pilar López Larrubia (1995) Ácidos N-2-(Azol-1(2)-il)etil-iminodiacéticos como indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $^1\text{H}$  RMN. Directora: P. Ballesteros. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.

Ricardo Scott Barrio (1995) Desarrollo y regionalización de la compartimentación metabólica cerebral detectada por Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13. Director: S. Cerdán. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid.

**Palabras clave**

Espectroscopía de Resonancia Magnética (MRS), Imagen por Resonancia Magnética (MRI), metabolismo del agua, metabolismo cerebral, sondas moleculares de pH y pCa, agentes de contraste para MRI.

## **Clonaje y expresión de una Caseína kinasa I en Dictyostelium discoideum**

Investigadora Principal:	Margarita Fernandez, Profesor Titular
Investigadores Asociados:	Carmela Calés, Profesora Ayudante UAM
Becarios Predoctorales:	Alicia Nuñez Gema Moreno
Personal de Apoyo:	Carmen Dominguez

### **Caracterización de actividades proteína kinasa en Dictyostelium discoideum**

( Alicia Nuñez)

Este proyecto se inició con el propósito de caracterizar actividades caseína kinasa I en Dictyostelium. En nuestro laboratorio se han caracterizado distintas actividades CKI basándose en parámetros cromatográficos y bioquímicos, pero su sensibilidad a proteólisis hace difícil el asignar las actividades detectadas a distintas entidades moleculares con completa seguridad, esto fue lo que nos decidió abordar el estudio de estas actividades clonando el/los genes que codifican para estas proteínas.

También hemos caracterizado una actividad proteína kinasa que tiene bastantes puntos en común con proteína kinasa C. La actividad caracterizada parece pertenecer a las recientemente descritas como relacionadas con PKC.

### **Clonaje y expresión de una CKI de Dictyostelium**

(Gema Moreno, Carmela Calés)

Hasta 1991 considerada una entidad única, se sabe en la actualidad que comprende una familia que constituye una rama distinta de la familia de proteína kinasas .

Homólogos de CKI en levaduras parecen regular aspectos del metabolismo de DNA, HRR25 de *Sacharomyces cerevisiae* codifica para una proteína reguladora de la reparación de rotura de bandas de DNA y mutantes en este enzima son incapaces de ir mas allá de la primera división meiótica. *hhp1+* y *hhp2+*, juegan un papel similar en *S. pombe*. Isoformas citoplásmicas han sido descritas tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*. YCKI y YCKII de *S. cerevisiae* aportan una actividad que es esencial para el crecimiento vegetativo, y cuando se sobreexpresan confieren halotolerancia La *cki2+* de *S. pombe* cuando se sobreexpresa conduce a un defecto en polaridad del crecimiento y morfología aberrante.

Este proyecto se está llevando a cabo, utilizando como sistema *D. discoideum* , que es un organismo especialmente útil para estudios genéticos y bioquímicos. La diferenciación en *Dictyostelium discoideum* se inicia al ayunar las amebas que están creciendo vegetativamente. Las amebas se agregan para formar una masa multicelular mediante quimiotaxis originada por señales pulsátiles de cAMP . El cAMP también induce la expresión de genes esenciales para agregación La diferenciación celular da como resultado final un cuerpo fructífero formado por células tallo y células espora

Para estudiar el papel que podría jugar la Caseína kinasa I en *Dictyostelium*, decidimos abordar su estudio clonando este tipo de actividades a partir de una genoteca de expresión de *Dictyostelium*. Hemos clonado y secuenciado una caseína kinasa I que presenta un alto grado

de homología con otros miembros de la familia, en particular con las de localización nuclear, tanto de células superiores como de levaduras y hemos estudiado la expresión de este gen tanto en diferenciación como en proliferación. El objetivo fundamental de este proyecto se centra, en líneas generales, en el estudio de la función de esta actividad construyendo transformantes en *Dictyostelium* que carezcan o sobreexpresen esta actividad y analizando su fenotipo. También estudiaremos las propiedades de esta proteína e intentaremos la búsqueda de alguno de sus posibles sustratos fisiológicos.

**Estudios de mecanismos moleculares implicados en la activación celular de linfocitos T (Transición G0 a G1 y entrada en S) y su bloqueo por  $\beta$ -endorfina" (en colaboración con la Dra. Susana Alemany).**

( Carlos Lisbona)

También he colaborado en el proyecto de la doctora Susana Alemany sobre mecanismos de activación de linfocitos. Los linfocitos son un material de trabajo especialmente interesante ya que están bien diferenciadas las fases G0 y G1 del ciclo celular. Los linfocitos aislados de bazo están quiescentes y mediante la señal adecuada, pueden entrar en G1, en esta fase comienzan a sintetizar interleukina 2 que es su factor de crecimiento y los receptores específicos de este, permitiéndole la progresión del ciclo. La tesis doctoral de Carlos Lisbona se ha centrado en el estudio de los mecanismos intracelulares que se activan al disparar la transición G0/G1 y la G1/S por medio de agentes mitogénicos como los ésteres de forbol, en particular la activación de las proteínas kinasas Raf y MAP; así como en el estudio de las fosfatasa implicadas en la terminación de la señal mitogénica. En la actualidad estamos estudiando el papel que juega la tirosina fosfatasa inducible Pac1 en la terminación de la señal.

**Publicaciones**

Lisbona, C., Alemany, S., Calvo, V. and Fernandez-Renart, M. (1994) Raf-1 and ERK2 kinases are required for phorbol 12,13-dibutyrate-stimulated proliferation of rat lymphoblasts. ERK2 activation precedes Raf-1 hyperphosphorylation. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2746-2754

**Palabras clave**

*Dictyostelium*, diferenciación, proteínas kinasas, caseína kinasa I, clonaje, señalización celular

## **Modulación de la actividad de la proteinasa multicatalítica y enfermedades autoinmunes.**

Investigador Principal:	José González Castaño. Profesor Titular.
Investigadores contratados:	Antonio Cuadrado Pastor. Ayudante LRU UAM.
Postdoctorales:	Paz Arizti Montañón (1994)
Predoctorales:	Susana Rodríguez Vilariño (Sept. 1995).
Personal de apoyo:	Joaquín Oliva Mayor

## **Modulación de la actividad de la (MCP) proteinasa multicatalítica.**

(P. Arizti, A. Cuadrado, J.G. Castaño).

Modulación por proteolisis selectiva: mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra las subunidades C2, C5 y C9 y un anticuerpo policlonal contra la MCP nativa, hemos encontrado que la forma activa de la MCP se diferencia de la forma latente por la degradación selectiva del COOH terminal del componente C2 de la MCP. Modulación por interconversion: 1) la caseína quinasa II copurifica con la MCP, siendo responsable de la fosforilación en serina de dos subunidades del complejo, C9 y C8. Estas dos subunidades se encuentran también fosforiladas in vivo y por mutagénesis dirigida hemos mostrado que los residuos de serina fosforilados se encuentran en el COOH terminal de la subunidad C8. 2) fosforilación por tirosina kinasas. Hemos la fosforilación in vivo e in vitro del proteasoma por PTKs de la familia *src* y en concreto la fosforilación en tirosina de la subunidad C3 del proteasoma.

## **Papel de la proteinasa multicatalítica en enfermedades autoinmunes.**

(P. Arizti, J.G. Castaño).

Describimos por primera vez la presencia de autoanticuerpos contra diferentes subunidades de la MCP en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Hemos continuado el estudio de estos autoanticuerpos y extendido el screening a más de 300 pacientes con enfermedades autoinmunes. Estos autoanticuerpos están siendo caracterizados mediante el uso de subunidades de MCP recombinantes (en la actualidad disponemos de las subunidades C2, C3, C5, C8, C9, LMP2, LMP7, Zeta y RC10-II) con el objeto de poder ofrecer un kit para el diagnóstico de la presencia de autoanticuerpos contra la MCP en enfermedades autoinmunes. Además hemos detectado y caracterizado la presencia de anticuerpos contra la ClpP de *E. coli* (proteasa cuya actividad quimiotripsina es similar a la del proteasoma eucariótico) en pacientes con cirrosis biliar primaria y hemos mapeado el epítipo que reconocen estos anticuerpos en la región COOH-terminal de la ClpP

## **Publicaciones**

Arizti, P. , Arribas, J. , Castaño J. G. (1994) Modulation of the multicatalytic proteinase complex by lipids, interconversion and proteolytic processing. *Enzyme Protein* 47, 285-295.

Arribas, J., Arizti, P. & Castaño, J.G. (1994). "Antibodies against the C2 COOH-terminal discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex". *J. Biol. Chem.* 269, 12858-12864.

**Palabras clave:** Proteasoma, lupus eritematoso.

## **Regulación del metabolismo**

Investigadores:	José M. Mato de la Paz, Profesor de Investigación. Isabel Varela Nieto, Colaboradora Científica. M <sup>a</sup> de los Angeles Pajares Tarancón, Colaboradora Científica.
Investigadores contratados:	Gregorio Varela Moreiras (hasta abril de 1995) Luis Alvarez García Matías Avila Zaragoza (desde enero de 1995) Antonio Gómez Muñoz (desde diciembre de 1994)
Becarios postdoctorales:	Yolanda León Alvarez David Jones
Becarios predoctorales:	Beatriz Gil Pérez Estrella Sánchez Góngora M <sup>a</sup> Luz Martínez Chantar Elena Alonso Aperte Jesús Mingorance Cruz Laura M. Frago Fernández (desde enero de 1995) Sonia Pérez Méndez (desde septiembre de 1995) Carmen Sanz Miguel
Personal de apoyo:	Francisco Garrido (desde octubre de 1994)
Investigadores visitantes:	Tom Rademacher y Hugo Caro. University College London (R.U.). Sven König Inst. f. Molekularbiologie & Biochemie, Berlin (Alemania). Fernando Giraldez. IBMG, Valladolid.

## **Alteraciones del metabolismo de la metionina en hepatopatías: relaciones estructura/función en la S-adenosilmetionina sintetasa.**

(J.M. Mato, M<sup>a</sup> A. Pajares, L. Alvarez, G. Varela, M.A. Avila, E. Sánchez, E. Alonso, J. Mingorance, M<sup>a</sup> L. Martínez, B. Gil y F. Garrido)

Estamos estudiando la regulación del ciclo de la metionina y, en especial la S-adenosilmetionina sintetasa. Fosforilación y regulación por oxido/reducción han sido los mecanismos estudiados hasta el momento como responsables de los cambios de actividad y estado oligomérico de la proteína. Con el fin de continuar estos trabajos se ha realizado la sobreexpresión de esta enzima, así como la obtención de mutantes en residuos clave de la proteína. Actualmente se está realizando la purificación de dichas formas (nativas y mutantes) con el fin de analizar tanto los cambios originados en su actividad, estado oligomérico y, la estructura de las mismas. Al mismo tiempo, se están llevando a cabo experimentos relacionados con el análisis de los efectos producidos en el ciclo en diversas hepatopatías. Finalmente, nuestro estudio de las enzimas de este ciclo se extiende actualmente a la betaína: homocisteína metiltransferasa.

## Señalización celular mediada por lípidos

(I. Varela Nieto, Y. León, A. Gómez Muñoz, D. Jones, C. Sanz, L. Frago, S. Pérez y J.M. Mato)

Nuestro laboratorio está interesado en el estudio de la actividad biológica y mecanismo de acción de los segundos mensajeros lipídicos derivados de los glicosil-fosfatidilinositoles (GPI) y esfingolípidos. Estamos estudiando su participación en el control del *desarrollo embrionario* del oído interno. A este respecto hemos descrito que el IGF-I es un modulador fisiológico de la proliferación del otocisto. El IGF-I estimula la hidrólisis de GPI, liberando inositol-fosfoglicano (IPG) que a su vez actúa modulando la expresión de los genes tempranos *c-fos* y *c-jun*. El bloqueo en la generación de IPG impide la estimulación inducida por IGF-I tanto de la proliferación celular como de los niveles de las oncoproteínas Fos y Jun. El IGF-I y el IPG también participan en la modulación de la diferenciación del ganglio cocleovestibular. Recientemente hemos desarrollado la metodología necesaria para estudiar el efecto de la sobre-expresión o del bloqueo de oncogenes, mediante vectores retrovirales RCAS, en el desarrollo del oído interno del embrión de pollo. *Análogos sintéticos* del IPG con la estructura básica glucosamina 1-6 inositol 1,2 fosfato cíclico inducen específicamente la proliferación o la diferenciación en este sistema. Esta batería de análogos sintéticos de IPG nos está permitiendo definir la relación existente entre los motivos estructurales de los distintos subtipos de IPG y sus efectos biológicos. Por último señalar que hemos comenzado a estudiar la función de los cerámidos y cerámidos fosfato en el control de la proliferación celular y de la apoptosis. Los cerámidos son potentes inductores de la diferenciación celular e inhiben la proliferación de las células en cultivo. Sin embargo, recientemente hemos observado que las formas fosforiladas de los cerámidos estimulan la síntesis de DNA y la división celular. Actualmente estamos investigando sobre el mecanismo de acción por el cual los cerámidos y cerámidos fosfato regulan los efectos anteriormente mencionados.

## Publicaciones

Alvarez,L., Mingorance,J., Pajares,M.A., Mato,J.M. (1994) Expression of rat liver S-adenosylmethionine synthetase in Escherichia coli results in two active oligomeric forms. *Biochem.J.* 301: 557-561.

Pajares,M.A., Durán,C., Corrales,F., Mato,J.M. (1994) Phosphorylation by PKC of rat liver S-adenosylmethionine synthetase. Dissociation and production of a monomer. *Biochem.J.* 303: 949-955.

Mato,J.M., Alvarez,L., Mingorance,J., Durán,C., Ortíz,P., Pajares,M.A. (1994) S-adenosylmethionine and the liver. En "Fat storing cells and liver fibrosis" (Surrenti,C., Casini,A., Milani,S., Pinzani,M., eds.), pp 304-313. Kluwer Academic Publishers (Lancaster, Gran Bretaña).

Caballería,J., Giménez,A., Corrales,F., Deulofeu,R, Alvarez,L., Parés,A., Pajares,M.A., Gassó,M., Rubio,M., Mato,J.M., Rodés,J. (1994) Effects of S-adenosylmethionine (SAME) on experimental liver fibrosis. En "Fat storing cells and liver fibrosis" (Surrenti,C., Casini,A., Milani,S., Pinzani,M., eds.) pp 314-321. Kluwer Academic Publishers (Lancaster, Gran Bretaña).

- Mato, J.M., Alvarez, L., Corrales, F., Pajares, M.A. (1994) S-adenosylmethionine and the liver. En "The liver: Biology and Pathobiology, 3rd Edition" (Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., Shafritz, D.A., eds.), pp 461-470. Raven Press (New York, USA).
- Pajares, M.A., Alvarez, L., Durán, C., Mingorance, J., Mato, J.M. (1994) Regulation of S-adenosylmethionine synthesis: structure/function studies. En "Methionine metabolism: molecular mechanisms and clinical implications" (J.M. Mato, A. Caballero, eds.), pp 73-78. Bouncopy S.A. (Madrid, España).
- Mato, J.M., Alvarez, L., Ortíz, P., Mingorance, J., Durán, C., Pajares, M.A. (1994) S-adenosyl-L-methionine synthetase and methionine metabolism deficiencies in cirrhosis. En "Hepatic Encephalopathy, Hyperammonemia and Ammonia Toxicity" (V. Felipo, S. Grisolia, eds.), pp 113-117. Plenum Publishing Corporation (New York, USA).
- Sanchez-Gutierrez, J.C., Sanchez-Arias, J.A., Valle, J.C., Guadaño, A., Samper, B., Mato, J.M., Feliu, J.E. (1994) Insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats: Changes in the glycosyl-phosphatidylinositol signalling system in isolated hepatocytes. *Endocrinology* 134: 1485-1492.
- León Y., Sanz C., and Varela-Nieto I. (1994) Intracellular mediators of IGF-I during otic vesicle development. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 185S.
- Jones, D. R., Clemente, R. and Varela-Nieto, I. (1994) Signalling at the epidermal growth factor receptor: role of glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 174S.
- Zapata, A., León, Y., Mato, J.M., Varela-Nieto, I., Penades, S. and Martín-Lomas, M. (1994) Synthesis and insulin-like activity of 6-O-(2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-D-myoinositol-1-phosphate and 6-O-(2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-D-*myo*-inositol-1,2-cyclic phosphate". *Carbohyd. Res.* 264, 21-31.
- Deigner, H.P., Mato, J.M., Pajares, M.A. (1995) Study of the rat liver S-adenosylmethionine synthetase active site with 8-azido ATP. *Biochem. J.* 308: 565-571.
- Varela-Moreiras, G., Alonso-Apperte, E., Rubio, M., Gassó, M., Deulofeu, R., Alvarez, L., Caballería, J., Rodés, J., Mato, J.M. (1995) *Hepatology* 22: 1310-1315.
- Mato, J.M., Alvarez, L., Varela, G., Ortíz, P., Pajares, M.A. (1995) Biochemistry and Molecular Biology of S-adenosylmethionine. Synthesis and metabolism in liver disease. En "Treatments in Hepatology" (V. Arroyo, J. Bosch, J. Rodés, eds.), pp 291-298. Masson S.A. (Barcelona, España).
- Waggoner, D.W., Martin, A., Dewald, J., Gómez-Muñoz, A. and Brindley, D.N. (1995) Purification and characterization of a novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 270, 19422-19429
- Gupta, S., Gómez-Muñoz, A., Matowe, W.C., Brindley, D.N. and Ginsberg, J. (1995) Thyroid-stimulating hormone activates phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells via stimulation of protein kinase C. *Endocrinology*, 136, 3794-3799.
- Gómez-Muñoz, A., Duffy, P.A., Martin, A., O'Brien, L., Byun, H.S., Bittman, R. and Brindley, D.N. (1995) Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA

synthesis and cell division: Antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol. Pharmacol.* 47, 883-889

Gómez-Muñoz, A., Waggoner, D.W., O'Brien, L. and Brindley, D.N. (1995) Interaction of ceramides, sphingosine and sphingosine-1-phosphate in regulating DNA synthesis and phospholipase D activity. *J. Biol. Chem.* 270, 26318-26325.

León, Y., Sánchez, J.A., Miner, C., Ariza-McNaughton, L., Represa, J.J. and Giráldez, F. (1995) Developmental regulation of Fos protein during proliferative growth of the otic vesicle and its relation to differentiation induced by retinoic acid. *Dev. Biol.* 167, 75-86.

Mato, J.M., and Varela-Nieto I. (1995) Phospholipids in cell signalling. En "*Molecular Cell Biology of Cardiovascular Diseases*". DOYMA S.A. Eds. Díez J., Dzau V.J., Ferrari R., and Frohlich E.D. Mosby/Doyma Libros. pp 33-40.

Sanz, M.C., León, Y. and Varela-Nieto, I. (1995) Raf kinases in the early development of the inner ear. *Oncology Reports.* 2, 935.

Clemente R., Jones, D., Ochoa P., Romero, G., Mato, J.M. and Varela-Nieto I. (1995) Role of glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis as a mitogenic signal for epidermal growth factor. *Cell. Signalling* 7, 411-421.

León Y., Sanz C., Giraldez F., Mato J.M., Represa J. and Varela-Nieto, I. (1995) Insulin and Insulin-like growth factor I stimulate cell proliferation in the early developing inner ear. *Endocrinology* 136, 3494-3503.

### **Tesis doctorales**

Cristina Durán González. Regulación de la S-adenosilmetionina sintetasa de hígado de rata por óxido/reducción y fosforilación por proteína quinasa C. Directora: M<sup>a</sup> de los Angeles Pajares Tarancón. Departamento de Bioquímica. Universidad Autónoma de Madrid. 1994

### **Palabras clave**

S-adenosilmetionina, S-adenosilmetionina sintetasa, glutation, homocisteína, folatos, esfingolípidos, inositol fosfoglicanos, segundos mensajeros, proliferación celular, desarrollo embrionario.

## **Fosforilación de proteínas en la señalización celular**

Investigador principal: Jorge Martín Pérez, Colaborador Científico

Becarios predoctorales: Borja Belandía Gómez (hasta el 31-10-1994)  
María Victoria Carretero Sánchez  
Marie Carmen Casero Martín (1994)  
Juan Angel Fresno Vara  
Cristina Pantoja Castro (desde el 1-1-95)

La fosforilación de proteínas, es un mecanismo de modificación post-traducciona con implicaciones relevantes en una gran variedad de mecanismos de señalización celular. Esta controlado por el equilibrio entre las actividades relativas de las proteínas quinasas y las fosfatasas que actúan sobre un determinado sustrato. Nuestro interés se ha centrado en entender los mecanismos de señalización intracelular controlados directa o indirectamente por fosforilación de proteínas, tales como la transformación oncogénica, la proliferación celular, etc. En la actualidad, nuestro trabajo esta encaminado a comprender los mecanismos de transducción de señales por prolactina. En particular, el papel de la familia Src de tirosinas quinasas en dichos procesos.

### **Proteínas Fosfatasas**

(Borja Belandía Gómez y Jorge Martín-Pérez)

La fosforilación de la proteína ribosomal S6 es uno de los procesos relevantes en la transducción de señales proliferativas inducidas por factores de crecimiento. Puesto que el oncogen v-src altera dichos mecanismos dando origen a una célula tumoral "desregulada", nos planteamos analizar en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) si este oncogen modificaba los sistema que controlan la fosforilación de S6 inducida por mitógenos. Comprobamos que mientras la actividad S6 quinasa no sufría modificaciones importantes respecto a la estimulación celular inducida por los factores de crecimiento presentes en el suero, el oncogen v-src inhibía la actividad S6 fosfatasa. Demostramos que esta actividad era debida a la proteína fosfatasa 1 (PP1) y que la transformación tumoral inhibía la actividad S6-PP1, sin alterar sus niveles de expresión respecto a la estimulación sérica. La PP1 es fosforilada por acción del suero y del oncogén v-src, pero en ambos casos ésta se produce en residuos de serina y treonina, no detectándose fosfotirosina en ningún caso. Por contra, los mapas fosfopeptídicos de PP1 inmunoprecipitada de células normales y transformadas muestra diferencias en los sitios de fosforilación en la proteína que podrían estar implicados en la diferente regulación de su actividad.

El ácido okadaico (AO) es un potente inhibidor de la fosfatasa 2A (PP2A) y en menor medida de la fosfatasa 1 (PP1), produciendo apoptosis en células mieloides. Por otra parte se ha descrito que la sobreexpresión de c-Myc, formando heterodímeros con Max, puede inducir apoptosis en algunos tipos celulares. Por este motivo y colaborando con el grupo del Dr. Javier Leon (Dpto. Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria) nos planteamos estudiar los efectos del AO a dosis muy bajas (15 nM) sobre las células K562. Pudimos comprobar que a esta concentración, el AO solo inhibía la actividad PP2A sin afectar a la de la PP1 provocando además apoptosis y disminución de los niveles de c-Myc y Max. La posterior eliminación del AO del medio revertía la actividad PP2A y la expresión de c-Myc y de Max, pero se incrementaba el número de células apoptóticas. Además, la

sobreexpresión de c-Myc no revertía la apoptosis. Concluimos por tanto, que la inhibición de la PP2A por AO induce la apoptosis y la disminución de la expresión de c-Myc y de Max, pero que ambos mecanismos aunque pueden estar relacionados, no están directamente concatenados.

### **Proteínas quinasas y señalización por Prolactina**

(Maria Victoria Carretero Sánchez, Juan Angel Fresno Vara, Cristina Pantoja Castro y Jorge Martín-Pérez)

Los receptores de prolactina pertenecen a la familia de receptores de citoquinas, proteínas que no teniendo actividad quinasa intrínseca, se asocian y activan proteínas tirosinas quinasas específicas. Hasta la fecha se había detectado que varias familias de tirosinas quinasas se asociaban con algunos receptores de citoquinas, entre ellas las de Jak y de Src. Puesto que el hígado es uno de los órganos donde se expresan mayor número de receptores de prolactina, en colaboración con el grupo de la Dra. Predestinación García Ruiz (CMB-UAM) analizamos en hepatocitos aislados de ratas lactantes si estos receptores respondían de forma análoga a lo descrito para los de otras citoquinas. Comprobamos que los receptores de prolactina se asociaban a una tirosina quinasa de 60 kDa, que identificamos como el producto del protooncogén src, la pp60c-src. Esta se encontraba pre-asociada al receptor en ausencia de hormona, pero la adición de prolactina aumentaba la cantidad de pp60c-src asociada al receptor y además estimulaba su actividad quinasa. Por otra parte, pudimos observar que la prolactina inducía la transcripción de los genes c-jun, c-fos y c-Src. Estos datos sugieren un papel relevante del protooncogén c-src en la señalización hepática de la prolactina.

Para analizar los mecanismos moleculares de interacción entre la familia de protooncogenes Src y el receptor de prolactina, determinar la importancia de dicha asociación y caracterizar las zonas intracelulares del receptor que son relevantes en la transducción de señales por prolactina, estamos trabajando con células en cultivo. En CEF transfectados con la forma larga del receptor (Prl-R1), hemos podido comprobar que la adición de prolactina induce la fosforilación en tirosina (Tyr) del receptor y de una proteína de unos 120 kDa. La doble sobreexpresión en estas células del receptor y de pp60c-src nos ha permitido comprobar que ambas moléculas interactúan. Sin embargo, puesto que la sobreexpresión del mutante "pp60c-src-quinasa defectivo" no altera la inducción por prolactina de estas fosforilaciones, cabría pensar que este protooncogen no es el responsable directo de las mismas. Por otra parte, la mutación de los residuos de Pro por Ala en la Caja 1 del Prl-R1 impide la fosforilación del mismo, indicando que esta es una secuencia clave en este proceso. Con el fin de determinar la importancia de la fosforilación en Tyr del Prl-R1, hemos producido una serie de delecciones de este receptor, que vamos a analizar. Dado que en las CEF transfectadas con Prl-R1 no detectamos respuesta mitogénica tras la adición de la hormona, hemos transfectado las células Baf-3 (pro-linfocitos B) con este receptor. En estas condiciones, las células crecen en presencia de 10 ng/ml de prolactina, lo que nos permite analizar el papel de la familia Src en los mecanismos proliferativos inducidos por la hormona, así como determinar que partes de la molécula del Prl-R1 son relevantes en estos procesos.

### **Publicaciones**

Belandia, B., Brautigan, D. y Martín-Pérez, J. (1994) Attenuation of ribosomal protein S6 phosphatase activity in chicken embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Mol.Cell.Biol.* 14:200-206.

Martín-Pérez, J. (1994) Proteínas quinasas: Productos de oncogenes en el citoplasma. En "Proliferación celular y Cancer". (M. Cascales y J. Rodríguez-Villanueva, Eds). pp149-175. Real Academia de Farmacia y Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cancer, Madrid, España.

Lastre, P., Martín-Pérez, J., Langa, C. y Bernabéu, C. (1994) Phosphorylation of the human TGF- $\beta$  binding protein Endoglin. *Biochem.J.* 301:765-768.

Berlanga, J.J., Fresno Vara, J.A., Martín-Pérez, J. y García-Ruiz, J.P. (1995) Prolactin receptor is associated with c-Src kinase in rat liver. *Mol.Endocrinol.* 11:1461-1467.

Lerga, A., Belandia, B., Delgado, M.D., Cuadrado, M.A., Richard, C., Ortiz, J.M., Martín-Pérez, J. y León, J. (1995) Down-regulation of c-myc and max genes is associated to inhibition of protein phosphatase 2A in K562 human leukemia cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 215:889-895.

### **Tesis doctoral**

Borja Belandia Gomez. Atenuación de la actividad proteína fosfatasa 1 en células transformadas por el oncogen v-src. Director: Jorge Martín Pérez. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1994

### **Palabras clave.**

Proteínas fosfatasa, proteínas quinasas, S6, PP1, PP2A, Acido Ocadaico, Caliculina, Inhibidor-2, c-myc, Max, c-fos, c-jun, c-src, Prl, Prl-R1, P-Ser, P-Thr, P-Tyr, apoptosis, transformación oncogénica, proliferación celular, CEF, K562, hepatocitos, Baf-3.

## **Actividades mitogénicas en efluentes peritoneales humanos**

Investigador principal: Francisco Vara, Profesor Titular.

Becaria Predoctoral: Susana Molina.

Este proyecto se está realizando en colaboración con el grupo del Dr. Selgas, del Servicio de Nefrología del Hospital "La Paz" de Madrid.

### **Caracterización de los factores de crecimiento presentes en los efluentes peritoneales humanos**

(S. Molina, y F. Vara)

La Diálisis Peritoneal Ambulatoria Continua (CAPD), es un tratamiento perfectamente establecido para enfermedades renales en fase terminal, que sustituye las funciones normales del riñón, seriamente dañadas o ausentes en estos pacientes. El líquido de diálisis que se introduce al enfermo se enriquece en distintos grados con diferentes componentes endógenos. Este líquido se transforma en efluente peritoneal como una consecuencia de la transferencia bidireccional de los distintos solutos.

Los efluentes peritoneales de pacientes en CAPD son capaces de estimular la síntesis de DNA en células Swiss 3T3 y fibroblastos humanos. La actividad mitogénica de los efluentes se pone de manifiesto cuando se añaden en presencia de un comitígeno como el EGF o la insulina. Existen grandes diferencias en la actividad que presentan los distintos efluentes peritoneales. Esta diferencia también se pone de manifiesto cuando se consideran los efluentes de un mismo paciente obtenidos a lo largo del tiempo.

Recientemente hemos presentado las primeras evidencias de que los efluentes peritoneales de pacientes en CAPD contienen más de una actividad mitogénica con pesos moleculares mayores de 10.000 daltons y al menos un inhibidor del crecimiento.

Cuando estos efluentes se concentran, dializan y se pasan por columnas de intercambio iónico, aparece una actividad mitogénica por sí sola, que ya no necesita la presencia de comitógenos para producir la división celular de la línea Swiss 3T3

### **Caracterización de las poblaciones celulares presentes en los efluentes peritoneales humanos.**

(C. Carcamo; M. Fdez de Castro; R. Selgas y F. Vara)

La presencia del líquido de diálisis hace que algunas de las células del peritoneo se suelten. Si esta situación se acentúa puede dejar a los enfermos en una situación muy precaria pudiendo quedar dañada la membrana basal. Si no se corrige a tiempo, esta membrana se pierde y aparece una fibrosis. La membrana se daña especialmente en los casos de peritonitis.

Estamos estudiando las distintas poblaciones de células que aparecen en los efluentes por diversos motivos. En primer lugar para ver cuáles son y si varían a lo largo del tiempo que los enfermos están en CAPD. Si los cambios tienen alguna relación con la función peritoneal y la incidencia de peritonitis. Si esas variaciones se podrían utilizar para predecir daños posteriores.

También queremos ver si se puede modificar la composición de células, en concreto aumentar la población de macrófagos con el objetivo de incrementar las defensas del enfermo, que harían que disminuyan los episodios de peritonitis.

### **Publicaciones**

Fdez de Castro, M.; Selgas, R.; Jimenez, C.; Bajo, M.A.; Martinez, V.; Romero, J.R.; Alvaro, F. y Vara, F. (1994). "Cell Populations Present in the Nocturnal Peritoneal Effluent of Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis and their Relationship with Peritoneal Function and Incidence of Peritonitis". *Perit. Dial. Int.* 14, 265-270.

Selgas, R.; Fdez de Castro, M.; Viguer, J.M.; Burgos, E.; Bajo, M.A.; Carcamo, C. y Vara, F. (1995). "Transformed Mesothelial Cells in Patients on CAPD for Medium- to Long-Term Periods". *Perit. Dial. Int.* 15, 305-2311.

### **Palabras Clave.**

Dialisis peritoneal, Efluentes peritoneales, Factores de crecimiento, Poblaciones celulares del peritoneo, Macrófagos y Peritonitis.

**Departamento de Bioquímica y Genética  
de Levaduras.**

## **Análisis molecular de transportadores iónicos en levadura**

Investigadora principal:	Pilar Eraso, Profesora Titular
Investigadores asociados:	María Jesús Mazón, Investigadora Científica Jesús Molano, Jefe Clínico, Hospital La Paz Francisco Portillo, Profesor Titular de Universidad
Becaria postdoctoral:	Irma Romero, Universidad Nacional Autónoma de México
Becarios predoctorales:	Dolores Falcón Juan Manuel Falcón

### **Mecanismo molecular de activación por glucosa de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de levadura.**

(I. Romero, F. Portillo, P. Eraso)

Mediante análisis de supresión intragénica y mutagénesis dirigida se ha establecido un modelo para la activación. Según éste el extremo carboxi-terminal, que actúa como un dominio autoinhibidor, se liberaría por un cambio conformacional inducido por la glucosa y mediado por la fosforilación de los residuos Ser-899 y Thr-912 de dicho dominio regulador. Estos dos residuos definen posibles sitios de fosforilación para caseína-kinasa II y para proteína-kinasa II dependiente de calmodulina respectivamente. Ahora hemos encontrado un nuevo residuo en el dominio regulador necesario para su interacción inhibitoria con el resto de la proteína: la His-914. La mutación H914Y da lugar a una ATPasa activada constitutivamente y además es capaz de suprimir la falta de activación del doble mutante S899A,T912A.

Hasta ahora no existe evidencia de fosforilación de la Thr-912 en el sitio consenso para la calmodulina-kinasa. Por ello hemos estudiado el efecto de antagonistas de calmodulina sobre la activación de la ATPasa por glucosa. Resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* con varios mutantes en la activación indican que estos antagonistas pueden estar afectando a algún componente de la membrana asociado a la H<sup>+</sup>-ATPasa y necesario para su actividad.

### **Estudio estructura-función de la proteína CFTR mediante mutagénesis dirigida y análisis de supresión intragénica**

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

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por la alteración de un único gen. Este gen se extiende a lo largo de 250 kb y codifica una proteína de 1480 aminoácidos llamada CFTR, que contiene dos dominios transmembrana, dos dominios de unión a nucleótido y un dominio regulador. CFTR pertenece a una superfamilia de transportadores y es un canal de iones Cl<sup>-</sup>. La mutación más frecuente en fibrosis quística es la pérdida de tres pares de bases que conlleva la eliminación de un residuo de fenilalanina en el dominio 1 de unión a nucleótido y determina una forma clínica severa de FQ. Además de la ΔF508 se han descrito más de 350 mutaciones distintas repartidas por toda la proteína. En levadura se ha descubierto recientemente un gen que codifica una proteína transportadora

de cadmio, el gen YCF1. Esta proteína presenta una gran homología con CFTR no sólo en su secuencia primaria (50% de identidad) sino también en su estructura. Nos proponemos el estudio de la relación estructura-función de la proteína CFTR creando, mediante mutagénesis dirigida, mutaciones FQ en la proteína YCF y realizando un estudio de supresión intragénica de dichas mutaciones.

### **Publicaciones**

Eraso, P. and Portillo, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose: Interaction between domains and identification of new regulatory sites. J. Biol. Chem. 269: 10393-10399.

### **Palabras clave**

H<sup>+</sup>-ATPasa, regulación por glucosa, estructura-función, mutagénesis dirigida, supresión intragénica, YCF, CFTR, *S. cerevisiae*.

## Control del flujo glicolítico en levadura

Investigador principal: Carlos Gancedo

Becarios predoctorales: Miguel A. Blázquez  
Francisco-Javier Gamo  
María José Lafuente

Personal de apoyo: Maria Isabel Bermúdez de Castro

## Control del flujo glicolítico en levadura

(C. Gancedo, M.A. Blázquez, F.J.Gamo)

En el estudio de mutantes que suprimen los efectos tóxicos de la glucosa sobre mutaciones glicolíticas se terminó de caracterizar la mutación *DGT1-1* (denominada previamente *SMU1*) El gen correspondiente regula la expresión de una serie de genes relacionados con el transporte de azúcares en levadura y la mutación obtenida elimina la represión catabólica. Esta mutación también suprime el fenotipo causado por una doble mutación en los genes que codifican la piruvato carboxilasa

Se ha caracterizado un supresor de la mutación *tps1* y se ha clonado el gen responsable de la supresión. Este gen ha resultado ser el gen *CAT3*. También se han estudiado los efectos de la mutación *qcr9* sobre una levadura portadora de la mutación *tps1*.

Se ha puesto a punto un método enzimático para la valoración cuantitativa de trehalosa-6-fosfato utilizando hexokinasa purificada de la levadura *Yarrowia lipolytica*.

## Secuenciación del genoma de levadura

(C.Gancedo, Maria J. Lafuente, F.J. Gamo)

Se ha continuado la secuenciación del cromosoma XV de *Saccharomyces cerevisiae* dentro del programa europeo de Secuenciación del Genoma de Levadura. En la parte izquierda del cromosoma XV cercana al telómero se han identificado varias tramas abiertas de lectura desconocidas hasta ahora en el mapa genético de la levadura.

## Publicaciones

Blázquez M.A., Stucka R., Feldmann H., and Gancedo C. (1994) Disruption of the gene *tps1*<sup>+</sup> encoding trehalose-6-P synthase in *Schizosaccharomyces pombe* does not affect growth in glucose but abolishes sporulation. J. Bacteriol., 176, 3895-3902.

Gamo F.J., Navas M.A., Blázquez M.A., Gancedo C. and Gancedo J.M. (1994) Catabolite inactivation of heterologous fructose-1,6-bisphosphatases and fructose-1,6-bisphosphatase- $\beta$ -galactosidase fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae* Eur. J. Biochem., 222, 879-884.

Blázquez M.A., Gancedo J.M. and Gancedo C. (1994) Use of *Yarrowia lipolytica* hexokinase for the quantitative determination of trehalose-6-phosphate. FEMS microbiology

Letters.121, 223-228 .

Gamo F.J., Lafuente M.J. and Gancedo C. (1994) The mutation *DGT1-1* decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* . J. Bacteriol., 176, 7423-7429 .

Casal M., Blázquez M.A., Gamo F.J. Gancedo C. and Leao C. (1995) Lack of lactate-proton symport activity in *pck1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiol. Letters, 128,279-282 .

Casas C., Aldea M., Casamayor A., Lafuente M.J. ,Gamo F.J., Gancedo C., Ariño J. and Herrero E. (1995) Sequence analysis of a 9873 bp fragment of the left arm of the yeast chromosome XV that contains the *ARG8* and *CDC33* genes, a putative riboflavin synthase beta chain gene and four new open reading frames. Yeast 11,1061-1067 .

Casamayor A.,Aldea M.,Casas C.,Herrero E.,Gamo F.J., Lafuente M.J. , Gancedo C. and Ariño J. (1995) DNA sequence analysis of a 13 kbp fragment of the left arm of yeast chromosome XV containing seven new open reading frames. Yeast 11, 12181-1288 (1995).

Blázquez M.A., Gamo F.J. and Gancedo C.(1995). A mutation affecting carbon catabolite repression suppresses growth defects in pyruvate carboxylase mutants from *Saccharomyces cerevisiae* FEBS Letters, 377,197-200.

Blázquez M.A. and Gancedo C. (1995) Mode of action of the *qcr9* and *cat3* mutations in restoring the ability of *Saccharomyces cerevisiae tps1* mutants to grow on glucose. Mol. Gen. Genet., 249, 125-129.

### **Tesis doctorales**

Aislamiento y caracterización de mutaciones que suprimen el efecto tóxico de la glucosa en mutantes glicolíticos de *Saccharomyces cerevisiae*. Francisco Javier Gamo. Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid. 1994

Un nuevo mecanismo de control de la glicolisis en *Saccharomyces cerevisiae*: la inhibición de las hexoquinas por trehalosa-6-fosfato. Miguel A. Blázquez. Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid. 1995

### **Palabras clave**

Glicolisis, genoma, trehalosa-6-fosfato,levadura,*Saccharomyces cerevisiae*.

## **Regulación de la expresión de genes gluconeogénicos en levadura**

Investigadora principal: Juana María Sempere (Gancedo), Profesora de Investigación

Investigador visitante: Stephanus Kilian (Julio-Diciembre 1994)

Becario predoctoral: Joelma Freire de Mesquita (desde Septiembre 1995)

Becarios postdoctorales: María Angeles Navas  
Olivier Vincent

### **Caracterización de elementos reguladores de la transcripción del gen *FBPI***

(O. Vincent, J. F. de Mezquita y J. M. Gancedo)

Se ha proseguido el estudio de elementos del promotor del gen *FBPI* capaces de activar la transcripción bajo el control de la fuente de carbono. Se han determinado las secuencias capaces de interactuar con proteínas reguladoras y se ha iniciado la purificación de una de estas proteínas. Se han explorado otras zonas del promotor con secuencias similares a las de algunos elementos reguladores conocidos para comprobar si son funcionales *in vivo*.

### **Regulación post-transcripcional de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de levadura**

(A. Navas, F. J. Gamo, M. A. Blázquez, C. Gancedo y J. M. Gancedo)

Se han estudiado los mecanismos de inactivación catabólica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa siguiendo la inactivación de proteínas de fusión con  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados obtenidos sugieren que hay por lo menos dos regiones de la bisfosfatasa que pueden actuar como señales para la inactivación y que ésta puede tener lugar por un mecanismo que no requiere la incorporación de la proteína a la vacuola. Se ha observado que la fructosa-1,6-bisfosfatasa de *S.cerevisiae* es sensible a la inhibición por trehalosa-6P a concentraciones fisiológicas mientras que otras bisfosfatasas ensayadas de diversos orígenes no muestran esta inhibición.

### **Estudio del valor fisiológico de los mecanismo de regulación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa**

(A. Navas y J.M. Gancedo)

Se ha comprobado que en una cepa de levadura que expresa una fructosa-1,6-bisfosfatasa insensible tanto a represión por glucosa como a inhibición alostérica se produce un ciclo inútil durante el crecimiento en glucosa a nivel del par fructosa-6P/fructosa-1,6-bisfosfato. Se han estudiado también las características metabólicas de cepas de levadura con una fructosa-1,6-bisfosfatasa carente de distintos mecanismos de control y se ha comprobado el valor fisiológico de estos mecanismos llevando a cabo experimentos de competición entre cepas con enzima regulada o no regulada. Se concluye que la ventaja selectiva es menos marcada de lo que se podría esperar pero suficiente para permitir que una cepa regulada desplace en un tiempo relativamente corto a una cepa no regulada.

## **Estudio de mutantes que afectan la expresión de enzimas sometidas a represión catabólica**

(S. Kilian y J. M. Gancedo)

Se han construido nuevas cepas afectadas en genes que controlan la represión catabólica y se ha medido como se regulan en estas cepas una variedad de enzimas. Se ha comprobado que al misma mutación puede tener efectos algo diferentes en levaduras con distinto "fondo genético".

### **Publicaciones**

Gamo F. J., Navas M.A., Blázquez M. A., Gancedo C. and Gancedo J. M. (1994) Catabolite inactivation of heterologous fructose-1,6-bisphosphatases and fructose-1,6-bisphosphatase- $\beta$ -galactosidase fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 222, 879-884

Blázquez M. A., Gancedo J. M. and Gancedo C. (1994) Use of *Yarrowia lipolytica* hexokinase for the quantitative determination of trehalose-6-phosphate. *FEMS Microbiology Letters* 121, 223-228

Mercado J. J., Smith R., Sagliocco F. A., Brown A. J. P. and Gancedo J. M. (1994) The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur. J. Biochem.* 224, 473-481

Vincent O. and Gancedo J. M. (1995) Expression of a yeast gene can be blocked by insertion of short DNA fragments between an UAS and the TATA box. *Curr. Genet.* 27, 387-389

Vincent O. and Gancedo J.M. (1995) Analysis of positive elements sensitive to glucose in the promoter of the *FBPI* gene from yeast. *J. Biol. Chem.* 270, 12832-12838

### **Tesis doctorales**

M. Angeles Navas. Valor fisiológico de los mecanismos de control de las enzimas gluconeogénicas en levadura. Directora: Juana M. Gancedo. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1994

Olivier Vincent. Identification et caractérisation d'éléments régulateurs de la transcription du gène *FBPI* de *Saccharomyces cerevisiae*. Directora: Juana M. Gancedo. UFR Biochimie. Université Paris VII. 1994

### **Palabras clave**

Gluconeogénesis, levadura, fructosa-1,6-bisfosfatasa, trehalosa-6-fosfato, represión catabólica, ciclos inútiles, factores de transcripción, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Mecanismo de transporte de glucosa en levadura**

Investigadora principal: Rosario Lagunas, Profesora de Investigación

Becarios predoctorales: Pilar Lucero  
Enriqueta Riballo

Personal de apoyo: Eulalia Moreno

## **Mecanismo de transporte de glucosa en levadura**

(E. Moreno, R. Lagunas)

Se ha dicho que el transporte de azúcar en *S. cerevisiae* es debido a difusión pasiva del azúcar a través de la membrana plasmática. Hemos investigado esta posibilidad para lo cual hemos medido el coeficiente de permeabilidad de las hexosas en este organismo. Los resultados muestran que este coeficiente es, al menos, dos o tres órdenes de magnitud menor de lo requerido para dar cuenta del componente de baja afinidad del transporte y hemos concluido que este componente no es debido a difusión pasiva.

## **Mecanismo de inactivación catabólica de proteínas de membrana plasmática en levadura.**

(E. Riballo, P. Lucero, R. Lagunas)

Hemos investigado el mecanismo de inactivación catabólica de los transportadores de membrana plasmática en levadura utilizando el transportador de maltosa como modelo experimental. Hemos concluido que, en contra de lo publicado por otros autores, esta inactivación que es debida a la degradación de los transportadores, es independiente de actividad proteína kinasa cAMP-dependiente. Además hemos demostrado que la degradación de estas proteínas ocurre en la vacuola tras su internalización por endocitosis y que es independiente de la función del proteasoma.

## **Publicaciones**

Lagunas R., and Díez-Masa J.C. (1994) Separation and analysis of 4'-epimeric UDP-sugars by ion-pair reversed-phase HPLC. *Anal. Biochem.* 216: 188-194.

Riballo E., Mazón M.J. and Lagunas, R. (1994) cAMP-dependent protein kinase is not involved in catabolite inactivation of the transport of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1192: 143-146.

Lucero P., Herweijer, M. and Lagunas R. (1994) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 33: 165-168.

Riballo E., and Lagunas R. (1994) Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K<sup>+</sup> and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 77-80.

Riballo E., Herveijer M., Wolf, D.H. and Lagunas, R. (1995) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177: 5622-5627.

Gamo F.J., Moreno E. and Lagunas R. (1995) The low-affinity component of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to free diffusion. *Yeast* 11: 1393-1398.

### **Tesis doctoral**

Enriqueta Riballo. Mecanismo de inactivación catabólica de las proteínas de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 1995.

### **Palabras clave**

Endocitosis, recambio de proteínas, inactivación catabólica, transportes de azúcares, proteínas de membrana plasmática, proteólisis, transporte de maltosa, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Secuenciación del genoma de la levadura**

Investigadora principal:	María Jesús Mazón, Investigadora Científica
Investigadores asociados:	Pilar Eraso, Profesora Titular Francisco Portillo, Profesor Titular Jesús Molano, Jefe Clínico, Hospital La Paz
Becaria predoctoral:	Victoria Escribano
Personal de apoyo:	Eulalia Morgado

## **Secuenciación del genoma de la levadura**

(Victoria Escribano, Pilar Eraso, Francisco Portillo y María Jesús Mazón)

Dentro del programa europeo para la secuenciación del genoma de levadura hemos secuenciado un fragmento del brazo izquierdo del cromosoma VII. El análisis de la secuencia revela nueve tramas de lectura abierta (ORF) completas y dos incompletas compartidas con los cósmidos adyacentes. Dos de los ORFs encontrados habían sido descritos previamente. Cinco de los ORFs restantes han sido seleccionados para estudio del fenotipo de mutantes interrumpidos, y estudio de su expresión génica y de su función,

## **Estudio estructura-función de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR) alterada en la fibrosis quística (FQ) mediante mutagénesis dirigida y análisis de supresión intragénica**

(Eulalia Morgado, Francisco Portillo, Jesús Molano, Pilar Eraso y María Jesús Mazón)

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por la alteración de un único gen. Este gen se extiende a lo largo de 250 kb y codifica una proteína de 1480 aminoácidos llamada CFTR, que contiene dos dominios transmembrana, dos dominios de unión a nucleótido y un dominio regulador. CFTR pertenece a una superfamilia de transportadores y es un canal de iones Cl<sup>-</sup>. La mutación más frecuente en fibrosis quística es la pérdida de tres pares de bases que conlleva la eliminación de un residuo de fenilalanina en el dominio 1 de unión a nucleótido y determina una forma clínica severa de FQ. Además de la  $\Delta F508$  se han descrito más de 350 mutaciones distintas repartidas por toda la proteína.

En levadura se ha descubierto recientemente un gen que codifica una proteína transportadora de cadmio, el gen YCF1. Esta proteína presenta una gran homología con CFTR no solo en su secuencia primaria (50% de identidad) sino también en su estructura. Nos proponemos el estudio de la relación estructura-función de la proteína CFTR utilizando la levadura como huésped para la expresión de proteínas quiméricas YCF1/CFTR y el estudio del efecto de mutaciones FQ sobre su funcionalidad en levadura.

## **Publicaciones**

Riballo, E., Mazón, M.J. and Lagunas, R. (1994) c-AMP dependent protein kinase is not involved in catabolite inactivation of the transport of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1192: 143-146.

García-Arranz, M. Maldonado, A.M., Mazón, M.J. and Portillo, F. (1994) Transcriptional control of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation. *J. Biol. Chem.* 269: 18076-1882.

**Palabras clave**

Secuenciación, interrupción génica, análisis funcional, estructura-función, quimeras, mutagénesis dirigida.

## **Análisis molecular de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de levadura.**

Investigador principal:	Francisco Portillo, Profesor Titular.
Investigadores asociados:	Pilar Eraso, Profesora Titular María Jesús Mazón, Investigadora Científica
Becario postdoctoral:	Heliodor Celis, Universidad Nacional Autónoma de México
Becarios predoctorales:	Ana Maria Maldonado Mariano Garcia-Arranz

### **Relación estructura-función de la H<sup>+</sup>-ATPasa.**

(Ana M. Maldonado, Heliodoro Celis, Pilar Eraso, Francisco Portillo)

Mediante mutagénesis dirigida se han identificado una serie de aminoácidos esenciales para la función del enzima. Uno de estos aminoácidos es la Lys-474. Este residuo está localizado en el sitio de unión de ATP del enzima y la caracterización bioquímica de enzimas portadoras de la mutación K474R sugiere que está implicado en la formación del intermediario fosforilado. Además la Lys-474 es el sitio de unión de la fluoresceína isotiocianato, un análogo estructural de la adenosina. Para identificar regiones del enzima implicadas en la formación del intermediario fosforilado hemos realizado un análisis de supresión intragénica de la mutación K474R. Se han aislado siete mutaciones supresoras. Una de las mutaciones supresoras (V396I) es específica de alelo y está localizada cerca del residuo Asp-378 que es el aminoácido fosforilado durante el ciclo catalítico. Esto apoya la idea de que la Lys-474 interacciona directamente con el dominio de fosforilación durante el ciclo catalítico. Tres mutaciones supresoras (V484I, V484I/E485K y E485K/E486K) están situadas cerca de la Lys-474 y pueden actuar como compensadoras de la alteración estructural introducida por la mutación K474R. Por último, tres mutaciones supresoras (A165V, V169I/D170N y P536L) no son específicas de alelo y parece que afectan a la localización del enzima en la membrana.

### **Aislamiento de genes implicados en la regulación de la expresión de la H<sup>+</sup>-ATPasa.**

(Mariano Garcia-Arranz, Ana M. Maldonado, María J. Mazón, Francisco Portillo)

La expresión del gen que codifica la H<sup>+</sup>-ATPasa (PMA1) está regulada por glucosa. Se han aislado mutaciones en siete genes distintos que afectan a dicha regulación. Por complementación de fenotipo se ha comenzado a aislar los genes correspondientes. Uno de dichos genes (APA1) codifica una proteína de membrana. La delección de APA1 afecta a la regulación de genes que codifican proteínas de membrana y cuya expresión es inducida por glucosa.

## **Publicaciones**

Eraso, P. and Portillo, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose: Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.* 269: 10393-10399.

García-Arranz, M., Maldonado, A.M., Mazón, M.J.& Portillo, F. (1994). Transcriptional Control of Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by Glucose. Cloning and characterization of a new gene involved in this regulation *J. Biol. Chem.* 269: 18076-18082.

Maldonado, A.M.& Portillo, F. (1995). Genetic Analysis of the Fluorescein Isothiocyanate Binding Site of the Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270: 8655-8659.

## **Palabras clave**

H<sup>+</sup>-ATPasa, regulación por glucosa, estructura-función, mutagénesis dirigida, supresión intragénica, *S. cerevisiae*.

**Departamento de  
Endocrinología Molecular.**

## **Regulación de la expresión de genes de cerebro dependientes de hormona tiroidea.**

Investigador Principal:	Juan Bernal Carrasco, Investigador Científico
Investigadora Contratada:	Ana Guadaño Ferraz (desde Agosto, 1995)
Becario postdoctoral:	Miguel Angel Iñiguez Peña (hasta Agosto, 1995)
Becarios predoctorales:	Beatriz Morte Molina Petra Isabel Lorenzo Ovejero Pierfrancesco Vargiu Maria José Escámez
Personal de apoyo:	Gloria Chacón Gallardo

### **Expresión de RC3/neurogranina mRNA en cerebro mediante hibridación in situ: especificidad regional en el control por hormona tiroidea**

(Miguel Angel Iñiguez, Ana Guadaño, Beatriz Morte, Juan Bernal)

La hormona tiroidea, triyodotironina o T3, es un factor epigenético importante en el desarrollo y función del sistema nervioso de los mamíferos. Actúa uniéndose a un receptor nuclear que actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando que, junto a receptores de retinoides, esteroides, y otras moléculas hidrofóbicas, constituye una amplia familia de moléculas implicadas en procesos de diferenciación y función celular.

Hace años comenzamos un estudio encaminado a la búsqueda de genes de cerebro regulados por T3 usando diversas técnicas de hibridación sustractiva y diferencial y que dio como resultado la identificación de varios genes que poseían una estricta dependencia del estado tiroideo del animal para su correcta expresión. Uno de estos genes es RC3, también llamado neurogranina, p17 y BICKS. RC3 es una proteína de 78 aminoácidos, muy conservada, que posee dominios de fosforilación por PKC y unión de calmodulina. Su expresión es predominantemente postnatal, localizándose en el soma, tallo dendrítico y espinas de neuronas del cerebro anterior y medio. Su función es desconocida, pero presumiblemente tiene un papel importante en procesos de plasticidad sináptica.

En estudios previos observamos que la expresión de RC3 a nivel de proteína y RNA eran dependientes de hormona tiroidea. Recientemente nos planteamos la pregunta de si todas las neuronas que expresan RC3 son sensibles a T3, o sólo lo son determinados grupos neuronales. Para ello estudiamos la expresión de RC3 mediante hibridación in situ durante el desarrollo y en animales adultos en cerebro de animales normales, hipotiroideos, y tratados con hormona. El resultado es que sólo algunas poblaciones celulares, con distribución regional, son sensibles a T3, especialmente en aquellos territorios en los que la expresión de RC3 durante el desarrollo ocurre después del día 10 postnatal en la rata. Estos grupos celulares están localizados en capa VI de la corteza cerebral, capa 2-3 de la corteza retrosplenial, núcleo caudado, circunvolución dentada del hipocampo, y sustancia negra. Estos resultados, además de identificar neuronas sensibles a T3 en cerebro, plantean nuevos estudios encaminados a identificar los determinantes moleculares de la distinta sensibilidad a T3.

## **Colocalización de RC3 con receptores de triyodotironina en neuronas sensibles e insensibles a esta hormona**

(Ana Guadaño, Maria José Escámez, Juan Bernal)

Como continuación de la línea anterior, además de las consecuencias funcionales de la regulación de RC3 en estas regiones, se plantea el problema de explicar la diferente sensibilidad de los distintos grupos celulares. En una primera aproximación, este fenómeno podría deberse a expresión diferencial de las distintas isoformas de receptor de T3 o a la presencia de la forma c-erbA $\alpha$ 2, generada mediante ajuste alternativo del gen c-erbA $\alpha$ . C-erbA $\alpha$ 2 no une T3 e inhibe la acción de las demás isoformas del receptor en transfecciones transitorias. Mediante estudios combinados de inmunohistoquímica de receptores de T3 e hibridación in situ de RC3, hemos descartado que la sensibilidad de este gen a T3 esté asociada a la expresión de alguna isoforma concreta. Por otro lado, existen neuronas muy sensibles a T3 que expresan niveles elevados de c-erbA $\alpha$ 2, lo que plantea serias dudas sobre su posible papel como inhibidor del resto de isoformas. Estos estudios plantean la posibilidad de que la sensibilidad a T3 por determinados grupos celulares venga determinada por determinantes neurogenéticos, por ejemplo la presencia de factores de transcripción que cooperen con el receptor de T3 en las regiones sensibles a esta hormona. La presencia de una línea neuronal (ver más abajo) sensible a T3 en cultivo, abre la posibilidad de la identificación de estos factores.

## **Regulación hormonal de RC3 en cultivos de neuronas hipotalámicas**

(Miguel A. Iñiguez, Beatriz Morte, Petra Lorenzo, Juan Bernal)

Dada la complejidad de los estudios in vivo, nos planteamos la necesidad de encontrar una línea neuronal en cultivo que expresara RC3 de forma regulada. En principio parecía poco probable la existencia de dicha línea dada la expresión restrictiva de RC3; sin embargo, tras el análisis de varias líneas encontramos que la línea GT1-7, procedente de neuronas del núcleo paraventricular inmortalizadas con el antígeno T, expresa muy débilmente RC3 en condiciones basales. Sin embargo, la adición de T3 al medio induce una fuerte respuesta del RNA de RC3. Estas células contienen niveles altos de receptor de T3, medido mediante binding con T3 radiactiva, y expresan las isoformas a1 y b1. Estos receptores son funcionales, como lo demuestra el hecho de que T3 es capaz de inducir la actividad de un gen indicador en una construcción que contiene el promotor de timidina kinasa y un elemento de respuesta a T3, sin necesidad de cotransfectar con receptores de T3. La adición de T3 al medio de incubación induce un rápido aumento del mRNA de RC3, ya evidente a las 4 horas, con un máximo de 20 veces a las 24-48 horas. T3 no actúa a nivel de estabilización del mRNA, puesto que la vida media del mRNA de RC3, que es larga, entre 20 y 24 horas, no se modifica tras el tratamiento con T3. Por otro lado, la respuesta a T3 a las 6 horas no se altera en presencia de cicloheximida, lo que sugiere que el efecto de T3 se debe a una acción directa del complejo T3-receptor sobre el gen RC3. En la actualidad estamos evaluando la posibilidad de un efecto a nivel de transcripción mediante ensayos de run-on. De forma alternativa, T3 podría actuar a nivel de estabilización de los transcritos nucleares.

## **Identificación y caracterización de secuencias reguladoras en el gen RC3**

(Beatriz Morte, Miguel Angel Iñiguez, Petra Lorenzo, J. Bernal.)

De lo dicho anteriormente se desprende que la acción de T3 sobre RC3 posiblemente sea directa, mediada por el complejo T3-receptor. Con objeto de identificar las secuencias reguladoras, hemos aislado y secuenciado 3 kbp de la región promotora de RC3. El promotor de RC3 contiene elementos de respuesta a retinoides y glucocorticoides, pero no a hormona tiroidea. La falta de elementos de respuesta a T3 en el promotor también se descarta por el hecho de que T3 no estimula la actividad del promotor de RC3 en células GT1 en condiciones en las que un gen indicador bajo control de un promotor heterólogo y elementos de respuesta a la hormona sí es inducible por T3. Aunque los elementos de respuesta a retinoides y a glucocorticoides tienen actividad en experimentos de transfección, sin embargo el gen endógeno, en células GT1 no es sensible ni a ácido retinoico ni a dexametasona, lo que plantea que estos elementos no son funcionales. En este sentido, el elemento de respuesta a ácido retinoico podría ser, en realidad un elemento de respuesta del receptor huérfano RZR, cuyo ligando ha sido propuesto recientemente que es la melatonina. En la actualidad se está estudiando esta posibilidad. Por otro lado, la posible existencia de un elemento de respuesta a T3 que explique la rápida inducción del gen de forma insensible a cicloheximida, en regiones del gen distintas de la región promotora se está analizando mediante inmunoprecipitación de fragmentos genómicos del gen con receptor de T3 y anticuerpos específicos.

### **Patrones de expresión y regulación hormonal de un gen de expresión específica de núcleo estriado.**

(Pierfrancesco Vargiu, Beatriz Morte, Miguel Angel Iñiguez, Juan Bernal, en colaboración con los Drs A. Muñoz del IIB y el Dr J.G. Sutcliffe, Scripps Research Institute, La Jolla, California)

Recientemente hemos identificado un nuevo gen sensible a hormona tiroidea. Se trata de un gen de expresión muy enriquecida en el núcleo estriado (SE6C, "Striatum-Enriched") que codifica un mRNA de unas 4 kb. La lectura de la secuencia codificante predice una proteína ligadora de GTP homóloga a RAP. El gen es de expresión postnatal, y mediante hibridación *in situ* hemos determinado que se expresa fundamentalmente en núcleo estriado, y débilmente en hipocampo. La hormona tiroidea es esencial para la expresión de este gen, que es prácticamente nula en animales hipotiroideos. A pesar de su expresión específica, hemos encontrado que la línea neuronal PC12 expresa este gen, y en la actualidad estamos evaluando la respuesta a T3 y otros factores en células PC12 parentales y PC12 que expresan niveles altos de c-erbA o v-erbA.

### **Publicaciones**

M.A. Iñiguez, B. Morte, A. Rodríguez-Peña, A. Muñoz, D. Gerendasy, J. G. Sutcliffe, J. Bernal. (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Molecular Brain Research*, 27: 249-257.

R. Pastor, J. Bernal, A. Rodríguez-Peña (1994) Unliganded c-erbA/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* 9: 1081-1089.

T. Iglesias, S. Llanos, M. Lopez-Barahona, A. Perez-Aranda, A. Rodríguez-Peña, J. Bernal, A. Höhne, B. Seliger, A. Muñoz (1994) C-erbA and v-erbA modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell Growth and Differentiation* 5: 697-704.

M. Alvarez-Dolado, T. Iglesias, A. Rodriguez-Peña, J. Bernal, A. Muñoz (1994) Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Molecular Brain Research*, 27: 205-214.

J. Caubín, T. Iglesias, J. Bernal, A. Muñoz, G. Marquez, J.L. Barbero, A. Zaballos (1994) Isolation of genomic DNA fragments tagging genes modulated in vivo by a transcription factor. *Nucleic Acid Research*, 22: 4132-4138.

T. Iglesias, S. Llanos, M. Lopez-Barahona, B. Seliger, A. Rodriguez-Peña, J. Bernal y A. Muñoz (1995) Induction of platelet-derived growth factor B/c-sis by the v-erbA oncogene in glial cells. *Oncogene*, 10: 1103-1110.

M. Lopez-Barahona, I. Fialka, J. M. Gonzalez, M. Asuncion, M. Gonzalez, T. Iglesias, J. Bernal, H. Beug y A. Muñoz (1995) Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO Journal*, 14: 1145-1155.

T. Iglesias, J. Caubín, A. Zaballos, J. Bernal, A. Muñoz (1995) Identification of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210: 995-1000.

J Bernal y J. Nunez (1995) Thyroid hormones and brain development (invited review). *European Journal of Endocrinology*. *Eur J Endocrinol* 133: 390-398.

### **Tesis doctoral**

Manuel Martín González. Actividad transcripcional de retinoides a través de sus receptores nucleares. Director: Juan Bernal Carrasco. Universidad Autónoma de Madrid. 1994

### **Palabras clave**

RC3/neurogranina, hibridación *in situ*, hormona tiroidea, hipotiroidismo, genes, promotores génicos, cerebro, receptores nucleares.

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

- Investigadora principal: Gabriella Morreale de Escobar, Profesora de Investigación, Doctor vinculado "Ad Honorem" (a partir de Junio 1995).
- Investigadores asociados: Francisco Escobar del Rey, Profesor de Investigación Doctor vinculado "Ad honorem"  
María Jesús Obregón Perea, Investigadora Científica
- Investigadores asociados de otros Centros:  
Antonio Ruiz Marcos, Profesor de Investigación, Instituto Cajal, Madrid  
Dr. José Quero, Jefe de la Unidad de Neonatología, Hospital "La Paz".  
Dr. Juan Tovar, Jefe de Cirujía Infantil, Hospital "La Paz", Madrid  
Prof. Pere Berbel, Facultad de Medicina, Alicante.  
Dr. Douglas Forrest, Roche Institute of Molecular Biology, New Jersey, Estados Unidos de América.
- Becarios postdoctorales: Rosa María Calvo, Beca asociada a Proyecto Miryam Asunción, asociada a Proyecto CEE
- Becarios predoctorales: Pablo Enrique Pedraza, Beca Iberoamérica del Ministerio de Asuntos Exteriores  
Hector Escobar Morreale, Beca de Ampliación de Estudios del FISS  
Susana Ares
- Personal de apoyo: Socorro Durán  
María Jesús Presas

### **Presencia de hormonas tiroideas en el compartimento embrionario**

(Rosa Calvo, Bernard Contempré (Universidad Libre de Bruselas, Bélgica), Enric Jauniaux (King's College de Londres, Reino Unido), M. Asunción, S. Durán, M. J. Presas, G. Morreale de Escobar.)

Se ha demostrado por radioinmunoanálisis la presencia de T4 en el líquido celómico que baña al embrión humano durante el primer trimestre de gestación, muy anterior al comienzo de la función tiroidea del feto. Su identidad con la T4 se confirmó por HPLC. Las concentraciones están relacionadas con los niveles séricos de T4 en la circulación materna. Las concentraciones de T4 en líquido celómico son mucho más bajas que en la circulación materna. Sin embargo, como también lo son las concentraciones de proteínas que ligan las hormonas tiroideas, el porcentaje de T4 que circula libre en el suero materno es inferior al que se determinó en líquido celómico. Se midió en suero materno y líquido celómico el porcentaje

de T4 en forma "libre", no ligada a proteínas, encontrándose que la diferencia entre ambos compartimento disminuye notablemente el gradiente de concentraciones entre la madre y el embrión.

Estos resultados sugieren que las hormonas tiroideas pueden tener un papel en el desarrollo temprano, ya que los receptores para hormonas tiroideas también se expresan en tejidos fetales, incluido el cerebro, antes de que comience a funcionar el tiroides fetal.

### **Efectos del flavonoide EMD 31288, suministrado a la madre, sobre el estado tiroideo de fetos a término**

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

El flavonoide de síntesis EMD 31288 inhibe el transporte de T4 y T3 por la transtiretina, *in vivo* e *in vitro*, e interfiere *in vitro* con la 5' desyodasa tipo I. Se ha estudiado el efecto de su administración a ratas preñadas. Se ha encontrado que las concentraciones de T3 y T4 en tejidos fetales están mucho más afectadas que en los maternos. Se encontró también que la infusión de este flavonoide de síntesis no sólo tiene los efectos extratiroideos indicados arriba, sino que también interfiere en la secreción de ambas hormonas por la glándula tiroidea, lo que dificulta aún más la interpretación de los resultados. Por este motivo se llevaron a cabo experimentos en ratas preñadas en la que la función tiroidea materna y la fetal se inhiben mediante la administración de mercaptoimidazol, y se evita el subsiguiente hipotiroidismo materno mediante la infusión de una dosis constante de T4. En estas condiciones se encontró que la administración del flavonoide sintético ejerce importantes efectos en el transporte de T4 y T3 por la transtiretina, pero no inhibe las desyodasas tisulares, tal y como se creía por estudios *in vitro*. Tanto en las madres como en sus fetos se observó que en los tejidos aumenta la cantidad de T3, formada a partir de T4, probablemente como consecuencia de la llegada de cantidades mayores de T4 a los tejidos, substrato de las desyodasas, cuya actividad no ha variado. Se prosiguen estos estudios en colaboración con los grupos del Prof. D. van der Heide (Universidad de Wageningen, Países Bajos) y Prof. Dr. J. Kohrle (Universidad de Wurzburg, Alemania), Proyecto ERB SC1\*CT-92-0831 de la CE.

### **Efectos del herbicida nitrofené, suministrado a la madre, sobre el estado tiroideo materno y fetal**

(B. Qi, 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 nitrofené (2-4-diclorofenil-p-nitrofenil éter) 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. Se ha testado esta hipótesis, midiendo concentraciones de T4 y T3 en plasma y tejidos maternos a distintas edades gestacionales, en ratas normales y las tratadas con nitrofené. Los resultados preliminares indican disminuciones importantes de las concentraciones de hormonas tiroideas en plasma materno y en placentas, así como en el plasma y pulmón de los fetos a término. Sin embargo, no hay diferencias si se refieren las cantidades de ambas hormonas al contenido de DNA pulmonar, que está disminuído. Prosiguen los experimentos para intentar dilucidar el posible papel de estos cambios del metabolismo de las hormonas tiroideas en la hipoplasia

pulmonar, y si ésta puede corregirse al compensar estos cambios mediante la administración de T4 o T3 exógena.

### **Concentraciones de hormonas tiroideas, y sus efectos, en ratas adultas tiroidectomizadas, infundidas con sólo T4, sólo T3, o una combinación de ambas**

(H. Escobar Morreale, F. Escobar del Rey, M. J. Obregón, Rosa Calvo, G. Morreale de Escobar, S. Durán, M.J.Presas)

El objetivo de esta línea es determinar si el organismo dispone de mecanismos que permitan normalizar todos los tejidos de un animal hipotiroideo con la administración exclusiva de tiroxina, como se hace en clínica, o si también se necesita algo de T3, como es el caso de un animal con función tiroidea normal. Se han llevado a cabo experimentos utilizando sólo T4, usando 10 dosis diferentes, suministradas por infusión subcutánea continua, comprendidas entre 0.2 y 8.0  $\mu\text{g}$  T4 / 100 g y día, o sólo con T3, en dosis que varían de 0.25 a 1.50  $\mu\text{g}$  T3 / 100 g y día. Se ha encontrado que con T4 sólo no es posible normalizar las concentraciones de T4 y T3 en todos los tejidos. Con T3 sólo tampoco se consigue alcanzar una normalización de las concentraciones de T3 simultáneamente en plasma y todos los tejidos. Sólo se consiguió un estado de eutiroidismo en todos los tejidos mediante la infusión simultánea de T4 con T3, siendo óptima de combinación de 0.9  $\mu\text{g}$  T4 + 0.15  $\mu\text{g}$  de T3 / 100 g y día. La adición de estas pequeñas cantidades de T3 disminuye a la mitad la cantidad de tiroxina necesaria. En esta dosis las dos hormonas están en relación molar parecida a la de la secreción tiroidea. Los resultados tienen claras implicaciones clínicas.

Durante la realización de estos estudios se han estudiado los posibles mecanismos que mantienen la homeostasis de la T3 cerebral, en modo especial la regulación por hormonas tiroideas de las diferente yodotironina desyodadas.

### **Hormonas tiroideas y cerebro adulto**

(Chapa, F., Kunneke, B., Calvo, R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Cerdán, S.)

Los resultados obtenidos al desarrollar la línea precedente han puesto de manifiesto que el cerebro del animal adulto posee mecanismos homeostáticos potentes, que mantienen la concentración de T3 en la corteza cerebral dentro de límites normales, tanto en situaciones de hipotiroidismo como de hipertiroidismo. Se necesita un estado de hipotiroidismo muy profundo para que disminuyan las concentraciones de T3 en cerebro, y ésto podría explicar los numerosos estudios en los que no se encontraron cambios de metabolismo cerebral en ratas adultas. En la mayoría de dichos estudios no se midieron las concentraciones de T3 en cerebro. Se ha estudiado el efecto del hipotiroidismo profundo (en ratas adultas tiroidectomizadas), sobre el metabolismo cerebral del (1,2- $^{13}\text{C}_2$ ) acetato, mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear, y empleando el modelo desarrollado por el Dr. S. Cerdán. Se ha demostrado un claro efecto del hipotiroidismo profundo en los ciclos tricarbónicos, tanto neuronales como gliales. Estos cambios desaparecen al suministrar T4 a las ratas hipotiroideas. Hasta la realización de este estudio, se consideraba que las hormonas tiroideas no regulaban el metabolismo energético en el cerebro adulto.

## **Deficiencia de yodo en España**

(F. Escobar del Rey, S. Durán, M.J.Presas)

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

Se ha estudiado la situación de la nutrición en yodo, medida por el yoduro urinario, en la población escolar de la Comunidad de Madrid, por encargo de la misma. Se ha medido la talla, peso, tamaño del tiroides y yoduro urinario en 2600 escolares, de 7-14 años, escogidos al azar entre 18 centros escolares de la CAM, escogidos asimismo por criterios epidemiológicos bien establecidos. Se ha encontrado que en la CAM hay deficiencia de yodo, si bien de grado moderado. Para declarar una zona como libre de deficiencia de yodo la Organización Mundial de la Salud considera que el porcentaje de escolares con bocio tiene que ser el 5%, o menos, y que la ingesta mínima adecuada para escolares de estas edades es de 120-150  $\mu\text{g}$  I por día. En la CAM, el 10 % de los escolares tiene bocio y el 68 % excreta menos de 120  $\mu\text{g}$  de yodo al día.

Se está extendiendo el estudio a la población de más riesgo: embarazada, lactantes y neonatos.

## **Deficiencia de yodo en niños prematuros**

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

Se ha estudiado el contenido en yodo en preparados para alimentación de prematuros, encontrándose que, en general, tiene un contenido de yodo insuficiente para suplir los requerimientos mínimos. Se ha llevado a cabo un balance de yodo, midiendo en 108 niños prematuros ingresados en Neonatología de La Paz (Dr. J. Quero) la cantidad de yodo ingerida y la cantidad excretada en orina de 24 horas, a los pocos días del nacimiento y sucesivamente con intervalos de 15 días, hasta el alta. Se ha encontrado que hay alteraciones de la función tiroidea que no sólo están relacionadas con el grado de maduración del prematuro y su patología, sino también con el grado de deficiencia de yodo.

Este estudio pone de manifiesto que debe evitarse la carencia de yodo en prematuros, mediante un control de su ingesta de yodo. Pero algunos de los datos obtenidos en este estudio sugieren que esto podría ser insuficiente para evitar totalmente las alteraciones tiroideas en esta fase del desarrollo, en la que el cerebro es especialmente sensible a alteraciones en los niveles de tiroxina circulante. Se propone iniciar un estudio multicentro para evaluar los posibles beneficios de la administración de T4 para acelerar el proceso de maduración, tal y como se viene haciendo en Amsterdam y Lovaina.

**Modelo experimental del cretinismo neurológico por deficiencia de yodo.** (P.E. Pedraza, J. R. Martínez Galán, F. Escobar del Rey, M. J. Obregón, G. Morreale de Escobar, A. Ruiz-Marcos)

Como continuación del estudio resumido en la memoria anterior, en el que se determinó el umbral de carencia de yodo a partir del cual fallan los mecanismos intra y extratiroideos que mantienen la homeostásis de la T3 cerebral, se han cruzado ratas mantenidas a dietas con diferente contenido en yodo. Se continuó con las mismas dietas durante la preñez y lactancia. Se encontró que no se obtienen fetos y neonatos con una disminución de la T3 cerebral hasta que se disminuye crónicamente la ingesta de las madres por debajo de 0.05  $\mu\text{g}$  de I y día,

frente a los 5-10  $\mu\text{g}$  I considerados adecuados para ratas gestantes.

Sólo es posible demostrar alteraciones morfológicas y funcionales del cerebro fetal y neonatal cuando se alcanza este grado extremo de carencia materna de yodo. En el hipocampo de fetos a término, se encontró una disminución en la proporción de glías radiales; en el núcleo estriado de neonatos de 12 días, se encontró una disminución de la densidad de procesos MBP + (myelin basic protein). La intensidad del cambio era proporcional a la concentración de la T3 cerebral. La descendencia de estas madres carentes de yodo presenta convulsiones audiogénicas permanentes, pues se siguen produciendo aunque se normalice la ingesta de yodo después del destete. Ninguna rata nacida de madres a dieta con contenido normal de yodo presentó este daño neurológico.

Se han comenzado experimentos para determinar el período crítico de desarrollo cerebral en el que tiene que haber carencia de yodo, y T3 cerebral disminuída, para que se produzcan estas alteraciones morfológicas y funcionales.

### **Estudios en ratones mutantes nulos del gen del receptor nuclear $\beta$ de hormona tiroidea (TR $\beta$ knock-out mice).**

(D. Forrest, P. E. Pedraza, M. J. Obregón, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar)

Los ratones knock-out TR $\beta$  representan un modelo experimental de resistencia periférica de hormonas tiroideas, desarrollado por el Dr. Douglas Forrest. Se está realizando un estudio muy completo de las concentraciones de hormonas tiroideas en numerosos tejidos, así como de las yodotironinas desyodadas de hipófisis, hígado, cerebro, grasa parda y grasa blanca, así como de varios parámetros de actividad hormonal en diferentes tejidos. Por ahora, el hallazgo más inesperado es que todos los ratones homocigotos sufren convulsiones audiogénicas, al igual que la progenie de ratas carentes de yodo. La hipótesis preliminar es que se produce daño cerebral tanto si falta la T3, como si falta su receptor, durante períodos definidos de desarrollo.

### **Publicaciones**

Ares, A., Quero, J., Morreale de escobar, G. (1994) Evolución de la ingesta de yodo en niños prematuros. Premios sobre Nutrición Infantil, Ediciones Nestlé, Espluig de Llobregat, 11-41.

Ares, S., Quero, J., Durán, S., Presas, M. J., Herruzo, R., Morreale de Escobar, G. (1994). Iodine content of infant formulas and iodine intake of premature babies. Arch. Dis. Child.:F184-F191Acta

Guadaño-Ferraz, A., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Innocenti, G.M., Berbel, P. (1994). The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. 1. Axon number. Dev. Brain Res. 81:293-308.

Joffe, R., Nobrega, J., Kish, S., Calvo, R., Dixon, L., Wilson, J., Morreale de Escobar, G. (1994) Regional thyroid hormone levels in rat brain. Psychoneuroendocrinology 19:773-777

Morreale de Escobar, G., Calvo, R., Escobar del Rey, F. and Obregón, M.J. (1994) Thyroid hormones in tissues from fetal and adult rats. Endocrinology 134: 2410-2415.

Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Calvo, R. and Escobar del Rey, F. (1994) Hormone nurturing of the developing brain: the rat model. En: "The damaged brain of iodine deficiency" (Stanbury, J.B. Ed), pp. 102-122, The Franklin Institute, Philadelphia, PA, USA

Ruiz-Marcos, A., Cartagena-Abella, P., Martínez-Galán, J.R., Calvo R, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. (1994) Thyroxine treatment and the recovery of pyramidal cells of the cerebral cortex from changes induced by juvenile-onset hypothyroidism. *J Neurobiology* 25: 808-818.

Morreale de Escobar, G. (1994) Hormonas tiroideas y desarrollo: Hormonas tiroideas maternal y fetales y desarrollo cerebral. *An. Real Acad. Medicina* 61:797-827

Pascual-Leone, A.M., Aláez, C., Calvo, R., Martin, M.A. and Obregón, M.J. (1994) Effects of thyroid hormone deiodination on regulation of thyroid axis in undernourished rats. *Am. J. Physiol.* 267: E983-E989.

Solé, E., Calvo, R., Obregón, M.J. and Meseguer, A. (1994) Thyroid hormone controls the cell-specific expression of kidney androgen regulated protein (KAP) gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* 135: 2120-2129.

Chapa, F., Kunneke, B., Calvo, R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Cerdán, S. (1995) Adult onset hypothyroidism and the cerebral metabolism of (1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>) acetate as detected by NMR. *Endocrinology*,136:296-305.

Ares, S., Pastor, I., Quero, J., Morreale de Escobar, G. (1995) Thyroid gland volume as measured by ultrasonography in preterm infants. *Acta Paediatr. (antes Acta Paediatr. Scand.)* 84:58-62

Ares, S., Pastor, I., Quero, J., Morreale de Escobar, G. (1995) Thyroidal complications, including overt hypothyroidism, related to the use of non-radiopaque silastic catheters for parenteral feeding of prematures, requiring injection of small amounts of an iodinated contrast medium. *Acta Paediatr. (antes Acta Paediatr. Scand.)* 84:579-81

Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. and Morreale de Escobar, G. (1995) Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J. Clin. Invest.* 96: 2828-2838.

Morreale de Escobar, G., Rodríguez-Hierro, F. Glándula Tiroideas, En: *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia*. Argente, J., Carrascosa, A., Gracia, R., Muñoz Calvo, M. T., Rodríguez, F.(eds) Edimsa, Madrid, 1995, 455-477.

### **Tesis Doctorales**

"Evaluación de la ingesta de yodo y función tiroidea en niños prematuros. Dra.Susana Ares Segura. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina, Junio 1994, Calificación: Apto "cum laude". Premio Extraordinario del Doctorado. Director: Gabriella Morreale de Escobar.

"Autorregulación de la activación biológica de las hormonas tiroideas y su especificidad tisular." Dr. Hector Escobar Morreale. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina, Noviembre 1994  
Calificación: Apto "cum laude". Director: Gabriella Morreale de Escobar.

**Palabras claves:** Thyroxine, triiodothyronine, iodine, brain, fetus, neonate.

## **Efectos de los genes c-erbA y v-erbA, y de la hormona tiroidea sobre la proliferación y diferenciación celular**

Investigador Principal: Alberto Muñoz Terol, Investigador Científico

Investigadoras Contratadas: Carme Caelles Franch  
Teresa Iglesias Vacas (hasta octubre de 1.995)

Becarios predoctorales: Manuel Alvarez Dolado  
Luis Francisco García Fernández  
José Manuel González Sancho  
Susana Llanos Girón  
Ana Cuadrado García (desde junio de 1.995)

Personal de apoyo: Margarita González Monge

### **Efecto de los genes c-erbA y v-erbA en células gliales**

(T. Iglesias, S. Llanos, C. Caelles y A. Muñoz, en colaboración con el Dr. H. Riese de Pharmacia Antibióticos-Farma, S.A. y la Dra. B. Seliger de la Universidad de Mainz)

Los genes c-erbA y v-erbA que codifican respectivamente por el receptor normal y una versión mutada oncogénica del receptor nuclear de la hormona tiroidea (T3). Hemos continuado el estudio de su efecto en la línea glial B3.1 establecida a partir de cerebro embrional de ratón. La expresión de ambos genes erbA mediante retrovirus recombinantes tiene efectos muy diferentes sobre la expresión génica y el crecimiento. Mientras que la sobre-expresión del proto-oncogén c-erbA provoca la inhibición de la proliferación y posterior muerte celular apoptótica por mecanismos que estamos intentando dilucidar, el oncogén viral v-erbA induce un aumento de la supervivencia de las células en ausencia de suero y del crecimiento celular en presencia de insulina, IGF-I o suero. Hemos caracterizado que ello se debe a la inducción por v-erbA de PDGF B, que actúa como un estimulador autocrino de las células. Al menos en parte como consecuencia de la inducción de PDGF B, las células que expresan v-erbA adquieren características del fenotipo transformado: forman focos en agar semi-sólido, crecen en suspensión y muestran capacidad invasiva in vitro. Dado el papel atribuido al PDGF B en la progresión de gliomas in vivo, estos resultados sugieren la posible intervención de mutaciones en erbA en el desarrollo de este tipo de cáncer.

### **Estudio de la regulación del gen de la prostaglandina D2 sintetasa específica de cerebro**

(L. F. García-Fernández y A. Muñoz, en colaboración con el Dr. J. Bernal del IIB, la Dra. E. Rausell, del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y los Dres. Y. Urade y O. Hayaishi del Osaka Bioscience Institute de Japón)

Hemos continuado el estudio de la regulación por T3/erbA del gen de la prostaglandina (PG) D2 sintetasa específica de cerebro, aislado originalmente mediante técnicas de hibridación substractiva. La PGD2 sintetasa es una de las proteínas mayoritarias del líquido

cefalorraquídeo. Además de sintetizar PGD2 a partir de PGH2, dada su homología con las lipocalinas es posible que la PGD2 sintetasa participe en el transporte de lípidos en el cerebro. El producto de su actividad enzimática, la PGD2, juega un papel importante en el control de la temperatura corporal, el ciclo vigilia-sueño, liberación de neurotransmisores... Mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ se ha analizado cómo el hipotiroidismo neonatal afecta la expresión temporal y regional de este gen durante el desarrollo cerebral de la rata. Por otra parte, el estudio de clones genómicos de rata nos ha permitido localizar elementos de respuesta transcripcional para T3/erbA en el promotor de la PGD2 sintetasa, lo que confirma su regulación directa.

### **Efectos de los genes erbA y la hormona tiroidea en células de epitelio de mama**

(J. M. González-Sancho, A. Cuadrado, M. González y A. Muñoz, en colaboración con los Dres. I. Fialka y H. Beug del Institut für Molekulare Pathologie de Viena)

Con objeto de estudiar los efectos de la sobre-expresión del receptor de la hormona tiroidea sobre el fenotipo y la proliferación de células de epitelio de mama, hemos infectado la línea celular normal EpH4 de ratón con retrovirus recombinantes que codifican la isoforma c-erbAa1. Estudios en cultivos celulares sobre plástico, filtros permeables y en geles tridimensionales de colágeno o Matrigel han permitido comprobar que la adición de hormona a células sobre-expresando c-erbA causa un aumento en la expresión de las estromelinas 1 y 2 y la colagenasa IVB (proteasas implicadas en la progresión maligna), la inhibición parcial del fenotipo epitelial diferenciado (pérdida de la distribución polarizada de proteínas, reducción de la adhesión y compactación celular y de la deposición de componentes de la membrana basal) y la destrucción de la capacidad morfogénica de las células EpH4. Actualmente, estamos estudiando posibles efectos sobre otros genes importantes para el mantenimiento del fenotipo epitelial, marcadores tumorales y oncogenes, y efectos sobre cocultivos con células estromales y mioepiteliales.

### **Búsqueda de genes regulados por hormonas tiroideas en cerebro**

(T. Iglesias, M. Alvarez, y A. Muñoz, en colaboración con el Dr. J. Bernal del IIB, los Dres. J. Caubín y A. Zaballos de Pharmacia Antibióticos-Farma y M. Zenke del Max Delbrück Center for Molecular Medicine de Berlin)

Estamos utilizando técnicas de biología molecular basadas en la PCR para la identificación de genes regulados por T3/T4 en cerebro. Mediante PCR genómico utilizando proteínas c-erbAb y RXRa traducidas in vitro y anticuerpos anti-c-erbAb, hemos inmunoprecipitado y amplificado por PCR fragmentos de DNA genómico de rata que contienen secuencias de unión de los heterodímeros c-erbA-RXR (caracterizadas por "gel-shift" y "footprinting"). El clonado y secuenciación de estos fragmentos y posterior estudio mediante ensayos de "run-on", Northern e hibridación in situ ha permitido caracterizar varios genes que son regulados transcripcionalmente por erbA/T3 durante el desarrollo cerebral. De ellos, uno corresponde a un gen implicado en procesos morforeguladores, otro codifica por una proteína del citoesqueleto y otros cuatro son desconocidos. Por otra parte, poblaciones de cDNA preparados a partir de mRNAs purificados de cerebro de rata normal e hipotiroidea han sido rastreadas mediante PCR diferencial ("differential display" PCR) utilizando amplímeros degenerados con el objetivo de clonar aquellos que correspondan a genes expresados diferencialmente. Hasta el momento, hemos aislado dos clones en cuya caracterización

estamos trabajando.

## **Estudio de la interacción entre receptores nucleares y el factor transcripcional AP-1**

(C. Caelles y A. Muñoz)

Durante los últimos años se ha descrito un fenómeno de mutuo antagonismo funcional entre varios receptores nucleares hormonales (erbA, de glucocorticoides GR, y del ácido retinoico RAR) tras su activación por sus ligandos específicos y el factor transcripcional AP-1, compuesto por dímeros de proteínas de las familias de los oncogenes c-jun y c-fos. Dada la importancia de la actividad AP-1 en la regulación de la expresión de genes cruciales para la proliferación y diferenciación celular, esta interacción puede ser clave para el control de procesos tan importantes como la transformación maligna o la respuesta inmune. Los datos sobre el mecanismo de esta interacción son escasos y muchas veces contradictorios, desconociéndose la base molecular de este antagonismo transcripcional. Utilizando líneas celulares con diferentes niveles endógenos de las diversas proteínas implicadas, transfecciones de formas mutadas y distintos agentes activadores, estamos investigando cómo la activación de c-jun bloquea la actividad transcripcional de erbA, GR o RAR y viceversa, los dominios funcionales implicados...

### **Publicaciones**

Teresa Iglesias, Susana Llanos, Mónica López-Barahona, Agustín Pérez-Aranda, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal, Alexandra Höhne, Barbara Seliger and Alberto Muñoz. (1994) C-erbA and v-erbA modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell Growth and Differentiation* 5: 697-704.

Julio Caubín, Teresa Iglesias, Juan Bernal, Alberto Muñoz, Gabriel Márquez, José Luis Barbero and Angel Zaballo. (1994) Isolation of genomic DNA fragments corresponding to genes modulated in vivo by a transcription factor. *Nucleic Acids Research* 22: 4132-4138.

Miguel A. Iñiguez, Beatriz Morte, Angeles Rodríguez-Peña, Alberto Muñoz, Dan Gerendasy, J. Gregor Sutcliffe and Juan Bernal. (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (Neurogranin). *Molecular Brain Research* 27: 205-214.

Manuel Alvarez-Dolado, Teresa Iglesias, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal and Alberto Muñoz. (1994) Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain. *Molecular Brain Research* 27: 249-257.

Montserrat Enjuto, Luis Balcells, Narciso Campos, Carme Caelles, Montserrat Arró and Alberto Boronat (1994). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 927-931.

Carme Caelles, Arno Helmborg and Michael Karin (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370: 220-223.

Salvatore Pessino, Carme Caelles, Pere Puigdomènech and Rubén H. Vallejos (1994).

Structure and characterization of the gene encoding the ferredoxin-NADP reductase-binding protein from *Zea mays* L. *Gene* 147, 205-208.

Florence Pelèse-Sienbenbourg, Carme Caelles, Jean Claude Kader, Michel Delseny and Pere Puigdomènech (1994). A pair of genes coding for lipid-transfer proteins in *Sorghum vulgare*. *Gene* 148: 305-308.

Teresa Iglesias, Susana Llanos, Mónica López-Barahona, Barbara Seliger, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal and Alberto Muñoz. (1995) Induction of platelet-derived growth factor B/c-sis by the v-erbA oncogene in a glial precursor cell line. *Oncogene* 10:1103-1110.

Mónica López-Barahona, Irene Fialka, José M. González-Sancho, Myriam Asunción, Margarita González, Teresa Iglesias, Juan Bernal, Hartmut Beug and Alberto Muñoz. (1995) Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal, polarized mammary epithelial cells. *EMBO Journal* 14: 1145-1155.

Teresa Iglesias, Julio Caubín, Angel Zaballos, Juan Bernal and Alberto Muñoz. (1995) Identification of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 995-1000.

Carme Caelles y Alberto Muñoz. (1995) Oncogenes Nucleares. *Revisiones en Cáncer* 9:97-104.

Arno Helmberg, Natalie Auphan, Carme Caelles and Michael Karin (1995). Apoptosis in a human leukemic cell line is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 14: 452-460.

Carme Caelles, Hanjo Hennemann and Michael Karin (1995). Cell cycle regulated phosphorylation of the pituitary transcription factor GHF-1. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6694-6701.

### **Palabras clave**

oncogén erbA, hormona tiroidea, genes, cerebro, diferenciación, proliferación, glía, epitelio de mama, receptores nucleares, AP-1.

## **Regulación de la proliferación y diferenciación de adipocitos marrones. Regulación de la actividad desyodasa por hormonas tiroideas.**

Investigadora principal:	Maria Jesús Obregón Perea, Investigadora Científica
Investigadores asociados:	Gabriella Morreale, Profesora de Investigación Francisco Escobar del Rey, Profesor de Investigación
Becarias predoctorales:	Bibian García García Eva Martín Molina Raquel Martínez de Mena
Personal de apoyo:	Arturo Hernández Martín

### **Proliferación de adipocitos marrones en cultivo primario.**

(Bibian García, Maria Jesús Obregón)

Estamos estudiando los mitógenos y hormonas que conducen a la proliferación de los adipocitos marrones en cultivo primario. Se utilizan células "precursoras" quiescentes obtenidas del tejido adiposo marrón de rata, estudiando los efectos de diversos factores de crecimiento y hormonas.

Los factores de crecimiento: EGF, PDGF, FGF estimulan la proliferación, y la vasopresina potencia dichas acciones proliferativas. La estimulación adrenérgica con norepinefrina también estimula la proliferación, y además sinergiza con los efectos de los factores de crecimiento. Sin embargo dichos efectos no son mimetizados por productores de cAMP (Forskolina...). Nos encontramos estudiando los mecanismos de interacción y sinergismo entre las rutas de estimulación adrenérgica (adenilato ciclasa y PKC) estudiando cuáles las vías de transducción de señales utilizadas en la proliferación.

Estamos iniciando el estudio de otras vías involucradas en la proliferación: ácidos grasos, factores producidos por células endoteliales...

Además se ha verificado que las células obtenidas tras la proliferación usando distintos mitógenos son auténticos adipocitos marrones, es decir, que expresan UCP y que no se producen otras especies celulares tras la estimulación mitogénica.

### **Regulación del gen de la UCP en adipocitos marrones por noradrenalina, hormonas tiroideas y glucocorticoides.**

(Eva Martín Molina, Arturo Hernández, Raquel Martínez de Mena, María Jesús Obregón)

Hemos estudiado el efecto de las hormonas tiroideas sobre la activación adrenérgica de la termogenina o UCP en cultivos primarios de adipocitos marrones, los cuales proliferan a partir de sus células precursoras, diferenciándose a adipocitos maduros.

Por estudios anteriores sabemos que la expresión del mRNA de UCP aumenta con norepinefrina (NE) solamente durante la fase de diferenciación (células postconfluentes), y que la T3 es necesaria y potencia enormemente los efectos adrenérgicos de la NE sobre el mRNA de termogenina. Los efectos son dependientes de la dosis y del tiempo de preexposición a T3 y requieren síntesis de proteínas. Estamos estudiando la modulación de

dicha activación por glucocorticoides, estudiando su efectos sobre la proliferación y sobre la activación termogénica de la UCP.

Además estamos estudiando dicha activación a nivel de promotor. Se ha clonado el promotor de la UCP, aislándose distintas porciones del extremo 5'terminal hasta 4.0 kb. La regulación del gen de la UCP se estudia en transfecciones transitorias usando cultivos primarios. Se ha optimizado el método de transfección. Se está estudiando la regulación del promotor por hormonas tiroideas, norepinefrina y glucocorticoides. También se están estudiando la unión de receptores nucleares (., RAR) a proteínas nucleares de estas células, usando ensayos de retardo en gel.

### **Regulación de las actividades 5'Desiodasa (5'D II) y 5 Desiodasa (5D) en adipocitos marrones en cultivo.**

(Arturo Hernández, María Jesús Obregón)

Estamos estudiando la regulación de la actividad de la enzima productora de T<sub>3</sub>, la 5'-Desiodasa-tipo II (5'D-II) en los mismos cultivos. La actividad de la 5'D-II se estimula adenérgicamente por norepinefrina y su activación es vía receptores β-adrenérgicos. La 5'D-II se inhibe por T<sub>4</sub>, mientras que la T<sub>3</sub> potencia enormemente la activación adenérgica de la 5'D-II. Esta acción de la T<sub>3</sub> es similar a la producida sobre el mRNA de UCP. El efecto de la T<sub>3</sub> sobre la NE es más notorio en células totalmente diferenciadas y no parece estar mediado por la ruta de la PKA o por aumentos del cAMP, y se puede mimificar usando agonistas adenérgicos β<sub>3</sub>.

A partir de observaciones de la rápida metabolización de la T<sub>3</sub> en nuestros cultivos primarios y de la medida de bajas concentraciones celulares de T<sub>3</sub>, (medidas por radioinmunoensayo) comenzamos a investigar las rutas de degradación de la T<sub>3</sub>, específicamente la ruta de degradación en el anillo interno (5D). Hemos medido altas actividades 5Desiodasa (5D) en nuestros cultivos, actividades que son inducibles por suero o por los factores de crecimiento presentes en él. La actividad 5D también se induce por T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, ácido retinoico y por NE, y las acciones de las hormonas tiroideas y NE son sincréticas. Las inducciones obtenidas con estas sustancias son más bajas que al estimular con factores de crecimiento.

Ambas enzimas (5'D-II y 5D) han sido clonadas durante 1995, lo que nos permitirá analizar si los efectos descritos tienen lugar a nivel transcripcional, como parecen indicar resultados obtenidos con ambas enzimas usando inhibidores de la síntesis de proteínas.

### **Receptores nucleares de T<sub>3</sub> y regulación de su expresión (mRNA) en adipocitos marrones en cultivo primario**

(Arturo Hernández, María Jesús Obregón)

En estudios anteriores hemos analizado la presencia de receptores nucleares de T<sub>3</sub> en adipocitos marrones en cultivo, encontrando que el número de receptores de T<sub>3</sub> es semejante a los valores descritos *in vivo* y que sus niveles aumentan a lo largo de la diferenciación de las células en cultivo. Se ha estudiado la vida media de los receptores.

En paralelo hemos analizado el mRNA para las formas α y β del receptor de hormonas tiroideas (TR), así como su modulación durante la diferenciación y por distintas hormonas. Los adipocitos marrones expresan las formas α<sub>1</sub> y α<sub>2</sub> (inactiva) y β<sub>1</sub> del TR. Cada uno de dichos mRNAs se regula de modo independiente, p.e. la T<sub>3</sub> produce un aumento (x2) del β<sub>1</sub>-

TR y una disminución de las formas a (al 50%), mientras que la insulina disminuye la expresión de las tres especies moleculares, incluso en tiempos cortos (6 horas).

### **Regulación de la actividad 5'Desyodasa en tejidos de rata por hormonas tiroideas**

(Rosa Calvo, María Jesús Obregón, Arturo Hernández, en colaboración con el grupo de la Dra Morreale. Ver participación en resúmenes de la Dra Morreale de Escobar)

Se han proseguido estudios anteriores sobre la regulación de las concentraciones de hormonas tiroideas y de las actividades desyodasas 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. También se ha explorado el efecto de dosis crecientes de T4 y/o T3. (Ver líneas de investigación Dra Morreale)

Se citan brevemente las líneas de investigación y situaciones experimentales donde se ha explorado la regulación de las desyodasas 5'D y 5D por hormonas tiroideas o insulina:

1. Efecto de la diabetes sobre el metabolismo tiroideo y las desyodasas en ratas gestantes y sus fetos. Efecto de la terapia sustitutiva con insulina y con T4.
2. Efecto de la subnutrición sobre las desyodasas cerebrales e hipofisarias durante el desarrollo de la rata. (en colaboración con el grupo de la Dra A.M. Pascual-Leone).
3. Estudios en ratas tiroidectomizadas adultas, en terapia de sustitución con dosis crecientes de T4, T3 o ambas hormonas en distintas proporciones. Regulación de las desyodasas en hígado, cerebro, hipófisis y BAT.
4. Efecto de la deficiencia de iodo sobre las desyodasas cerebrales e hipofisarias.
5. Efecto de los flavonoides sobre la economía materno-fetal y sobre las desyodasas maternas y fetales.

### **Publicaciones**

Morreale de Escobar, G., Calvo, R., Escobar del Rey, F. and Obregón, M.J. (1994) Thyroid hormones in tissues from fetal and adult rats. *Endocrinology* 134: 2410-2415.

Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Calvo, R. and Escobar del Rey, F. (1994) Hormone nurturing of the developing brain: the rat model. En: "The damaged brain of iodine deficiency" (Stanbury, J.B. Ed), pp. 102-122, The Franklin Institute, Philadelphia, PA, USA

Pascual-Leone, A.M., Aláez, C., Calvo, R., Martín, M.A. and Obregón, M.J. (1994) Effects of thyroid hormone deiodination on regulation of thyroid axis in undernourished rats. *Am. J. Physiol.* 267: E983-E989.

Solé, E., Calvo, R., Obregón, M.J. and Meseguer, A. (1994) Thyroid hormone controls the cell-specific expression of kidney androgen regulated protein (KAP) gene in S3 mouse kidney cells. *Endocrinology* 135: 2120-2129.

Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. and Morreale de Escobar, G. (1995) Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J. Clin. Invest.* 96: 2828-2838.

Hernández, A. and Obregón, M.J. (1995) Presence of growth factors-induced type III iodothyronine 5-Deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology* 136: 4543-4550

**Palabras clave**

Adipocitos marrones, hormonas tiroideas, T4, T3, UCP, desyodasas, 5'D, 5D,

## **Regulación de la diferenciación de células nerviosas y la actividad de promotores neuro-específicos por receptores nucleares**

Investigadora principal: Angeles Rodríguez Peña, Colaboradora Científica

Investigador contratado Domingo Barettino Fraile

Becario Postdoctoral: Rosa M. Pastor Rasal

Becarios predoctorales: Nieves Ibarrola de Andrés  
Pilar Martínez García  
Sonia Vega de los Reyes

### **Regulación de la diferenciación de oligodendrocitos**

(N. Ibarrola de Andrés y A. Rodríguez-Peña, con la colaboración del Dr. M. Noble del Ludwig Institute, Londres)

Los oligodendrocitos se originan de células precursoras conocidas como O2A, ya que dan lugar, si el medio de cultivo contiene PDGF, a oligodendrocitos, o en presencia de suero, a astrocitos tipo 2. Utilizando cultivos primarios, tanto mixtos como de precursores puros, hemos demostrado que las hormonas tiroideas son necesarias para este proceso. La expansión clonal de precursores purificados nos ha permitido identificar la existencia de una diferenciación asimétrica no descrita hasta el momento, responsable de la generación de clones mixtos de células precursoras y oligodendrocitos maduros, y que permitiría explicar la presencia de precursores en el animal adulto.

### **Diferenciación de líneas de neuroblastoma por hormonas tiroideas y la regulación de la expresión neurotrofinas y sus receptores.**

(S. Vega de los Reyes y A. Rodríguez-Peña).

Hemos demostrado que la expresión estable del receptor de hormonas tiroideas en la línea de neuroblastoma N2a induce la expresión del receptor de neurotrofinas trkB, disminuyendo su capacidad de proliferación en medio definido. Este mismo efecto se produce en dos clones N1 y N7 del neuroblastoma NB41A, seleccionados por sus diferentes características de adhesión a la matriz extracelular, y que serán utilizados como modelo para estudiar la(s) interacción(es) entre matriz extracelular, neurotrofinas y hormonas tiroideas durante el proceso de diferenciación.

### **Regulación del protooncogen c-fos por el receptor de hormonas tiroideas en el neuroblastoma N2a.**

(R. Pastor Rasal y A. Rodríguez-Peña)

La expresión del oncogen c-fos es muy alta en la línea N2a. En todos los clones de células N2a con expresión del receptor de hormonas tiroideas (TR), dicha expresión se hace casi indetectable, sin modificar la vida media de su mensajero. Este efecto transcripcional también

se produce en transfecciones transitorias con un vector de expresión para TR y el promotor de c-fos unido al gen CAT. La presencia de hormona tiroidea es capaz de inhibir parcialmente la inducción de c-fos por forskolina, sin afectar la producida por suero o ésteres de forbol, lo que sugiere que las secuencias del promotor de c-fos implicadas en esta regulación podrían ser las responsables a la respuesta a AMPc (CRE).

### **Regulación del promotor de la proteína básica de la mielina (MBP)**

(P. Martínez García, N. Ibarrola de Andrés, D. Baretino y A. Rodríguez-Peña)

Nuestro grupo ha demostrado que en el hipotiroidismo se produce una disminución de la expresión de los genes de mielina. Sin embargo, y sorprendentemente, esta disminución se recupera de forma espontánea a medida que avanza el desarrollo. Con el fin de estudiar el mecanismo por el que la expresión de estos genes se normaliza en el animal hipotiroideo, se han realizado experimentos de transactivación con un fragmento de 1.2 Kb del promotor de MBP (que contiene un elemento de respuesta para hormonas tiroideas) en las células de glioma C6. Nuestros resultados demuestran que el ácido 9-cis ácido retinoico estimula la actividad de este promotor y que esta activación está mediada por la misma secuencia caracterizada como el elemento de respuesta a T3.

### **Caracterización del promotor del receptor de neurotrofinas, TrkB**

(P. Martínez García, D. Baretino y A. Rodríguez-Peña, con la colaboración del Dr. M. Metsis, del Karolinska Inst. Stockholm).

Se ha caracterizado un fragmento de 7Kb en posición 5' de la región codificante del gen de trkB. Hemos demostrado la presencia de dos promotores. En el promotor P1, que se encuentra localizado en el primer intron, hemos determinado el sitio de inicio de transcripción y la presencia de un elemento de respuesta a ácido retinoico, responsable de la inducción de trkB por ácido retinoico en algunas líneas de neuroblastoma humanas. Ambos promotores se activan por el receptor de hormonas tiroideas (TR), sin que se requiera la presencia de su ligando, como habíamos demostrado que ocurría en las líneas de neuroblastoma de ratón que expresan de forma estable TR.

### **Publicaciones**

Teresa Iglesias, Susana Llanos, Mónica López-Barahona, Agustín Pérez-Aranda, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal, Alexandra Höhne, Barbara Seliger and Alberto Muñoz.(1994). C-erbA and v-erbA modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell Growth and Differentiation*, 5, 697-704 .

Rosa Pastor, Juan Bernal and Angeles Rodríguez-Peña.(1994). Unliganded c-erbA/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* 9, 1081-1089.

Manuel Alvarez-Dolado, Teresa Iglesias, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal and Alberto Muñoz. (1994). Expression of neurotrophins and the trk family of neurotrophin receptors in normal and hypothyroid rat brain". *Molecular Brain Research*, 27, 249-257.

Miguel A. Iñiguez, Beatriz Morte, Angeles Rodríguez-Peña, Alberto Muñoz, Dan Gerendasy, J. Gregor Sutcliffe and Juan Bernal.(1994).Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (Neurogranin)".  
Molecular Brain Research 27, 205-214.

Teresa Iglesias, Susana Llanos, Mónica López-Barahona, Barbara Seliger, Angeles Rodríguez-Peña, Juan Bernal, and Alberto Muñoz.(1995). Induction of platelet-derived growth factor B/c-sis by v-erbA oncogene in glial cells. Oncogene 10, 1103-1110 .

Angeles Rodríguez-Peña, Manuel Botana, Margarita González and Féslix Requejo.(1995) Expression of neurotrophins and their receptors in sciatic nerve of experimentally diabetic rats. Neuroscience Letters 200, 37-40.

**Palabras clave.**

Receptores nucleares, hormonas tiroideas, acido retinoico, oligodendrocitos, neuroblastomas, mielina, neurotrofinas, trkB, receptores de neurotrofinas, diferenciación.

**Departamento de Enzimología y  
Patología Molecular.**

## **Mecanismos de control del metabolismo glucídico.**

Investigador principal:	Juan José Aragón Reyes, Catedrático de Universidad.
Becarios predoctorales:	Antonio Estévez García. Cristina Sánchez Martínez. M <sup>a</sup> Belén Santamaría Jiménez.
Investigadores visitantes:	Griselle Rodríguez Martínez, Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba. Hasta Febrero de 1994. Francisco Román González Pacheco, Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba. Marzo a Julio de 1994. Alicia Fernández Ordóñez, Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba. Septiembre a Diciembre de 1994. Daniel Villanueva Torregroza, Universidad del Atlántico, Departamento de Biología. Barranquilla, Colombia. Junio a Noviembre de 1994.
Personal de Apoyo:	Valentina Sánchez López, Ayudante Diplomado de Investigación.

## **Bases moleculares de los mecanismos de control alostérico de la fosfofructokinasa de células eucarióticas.**

(A. Estévez, C. Sánchez, M.B. Santamaría, V. Sánchez y J.J. Aragón)

Con esta línea tratamos de estudiar los requerimientos estructurales responsables del control de la fosfofructokinasa (PFK) de eucariotes, para lo que empleamos como modelos un isozima no alostérico, el del mohó unicelular *Dictyostelium discoideum*, y otro regulador, el de tumor ascítico de Ehrlich. Con el enzima de *D. discoideum* hemos estudiado su patrón de expresión durante el desarrollo, parece estar codificado por un solo gen y podemos disponer ya de él como proteína pura en cantidad de miligramos a partir de su expresión en una cepa de levadura PFK<sup>-</sup> (en colaboración con el Dr. J.J. Heinisch del Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität de Düsseldorf), lo que nos ha permitido iniciar la manipulación específica de su secuencia a nivel de residuos y regiones identificadas por nosotros como de valor potencial para dar cuenta de la ausencia de conducta reguladora. El sistema de expresión empleado también nos está permitiendo observar los efectos que para el metabolismo y la fisiología celular puede tener la sustitución de una PFK alostérica por otra que no lo es. Respecto al enzima de tumor ascítico, hemos aislado el cDNA completo de la subunidad tipo C y localizado en su secuencia sitios probables para el ligamiento de substratos y efectores. Tratamos ahora de expresarlo de forma heteróloga para poder realizar modificaciones de su secuencia en comparación con el enzima de *D. discoideum*.

### **Metabolismo de glutamina y glucosa en células de hibridoma.**

(F.R. González, G. Rodríguez, A. Fernández, V. Sánchez y J.J. Aragón, en colaboración con el Centro de Inmunología Molecular de La Habana)

Estamos estudiando las vías de metabolización de glutamina y glucosa como sustratos energéticos en el hibridoma IOR T3, lo que además de su interés básico es esencial para poder mejorar el crecimiento de estas células. Hemos observado que alrededor del 30% de la glutamina que utilizan se acumula en el medio en forma de glutamato, del resto, un tercio se metaboliza vía glutamato deshidrogenasa (reacción en cambio muy poco empleada en ese sentido en células tumorales) y un 60% se transamina (mayoritariamente a alanina). La inhibición de la transaminación reduce el consumo de glutamina sin afectar a su transporte. La glucosa, de la que estas células son totalmente dependientes para la producción de ATP, se consume de forma prácticamente equimolar con la producción de lactato y no modifica la utilización de glutamina pero sí la transaminación. La glutamina inhibe la producción de lactato y, fuertemente, la oxidación de glucosa. Tratamos ahora de averiguar los mecanismos responsables de los efectos observados y de evaluarlos en condiciones mas próximas a las habituales de cultivo.

### **Empleo de galactosil-xilosas en la evaluación *in vivo* de lactasa intestinal.**

(D. Villanueva y J.J. Aragón, en colaboración con los doctores A. Fernández Mayoralas y M. Martín Lomas del Grupo de Carbohidratos del Instituto de Química Orgánica del CSIC, Madrid)

Estamos interesados en la optimización de una metodología de evaluación *in vivo* de la actividad lactasa intestinal en ratas, con vistas a su aplicación en humanos como técnica incruenta de diagnóstico de la deficiencia de este enzima. La metodología original, diseñada por Alberto Sols, se basó en la administración oral de un análogo estructural del sustrato, 3-metil-lactosa, determinándose por cromatografía de gases en orina la 3-metil-glucosa formada. Hemos sustituido ese disacárido por una mezcla de 2- 3- y 4-galactosil-xilosas que rinde xilosa y cuya determinación puede hacerse mediante un simple método colorimétrico, al alcance por tanto de cualquier centro hospitalario. Se ha puesto a punto una técnica de síntesis enzimática del disacárido que resulta mas sencilla, barata y de elevado rendimiento, habiéndose evidenciado que la lactasa intestinal hidroliza la galactosil-xilosa *in vivo*. La aparición de glucosa en la orina se correlaciona con la actividad del enzima determinada *in vitro* a lo largo del crecimiento de ratas lactantes. Esto ha permitido también observar el curso de la caída fisiológica de este enzima tras el destete en el mismo animal, lo que hasta ahora no había sido posible. Pretendemos plantear un ensayo clínico en lactantes, donde otros procedimientos incruentos no son posibles. Esta metodología puede ser también de utilidad en adultos por su posible inocuidad y sencillez de medios, así como en estudios, tanto clínicos como experimentales, de integridad funcional de la mucosa intestinal.

## **Publicaciones**

Martínez-Costa, O.H., Estévez, A.M., Sánchez, V. and Aragón, J.J. (1994) Purification and properties of phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum*. Eur. J. Biochem. 226: 1007-1017.

Estévez, A.M., Heinisch, J.J. and Aragón, J.J. (1995) Functional complementation of yeast phosphofructokinase mutants by the non-allosteric enzyme from *Dictyostelium discoideum* ". FEBS Lett. 374: 100-104

## **Patente**

Aragón, J.J., Cañada, F.J., Fernandez-Mayoralas, A., López, R., Martín-Lomas, M. y Villanueva, D. Procedimiento enzimático de obtención de  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1995.Nº de solicitud: 9502185.

## **Tesis doctoral**

Antonio M. Estévez García. Clonación, secuenciación y expresión de la fosfofructokinasa de *Dictyostelium discoideum*. Producción del enzima en levadura. Director: Juan J. Aragón. Universidad Autónoma de Madrid. 1995.

## **Palabras clave**

Fosfofructokinasa, lactasa intestinal, glutamina, glicolisis, gluconeogénesis, regulación alostérica, *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, tumor ascítico, hibridoma.

## **Genética Molecular Humana. Búsqueda e identificación de genes humanos. Caracterización de mutaciones causantes de hemofilia B en la población española.**

Investigador Principal:	Antonio Coloma Jerez. Profesor Titular (realizó una estancia sabática en el laboratorio del Dr. Eric Lander, del Whitehead Institute for Biomedical Research de Cambridge, USA, 1993-94)
Investigadores Asociados:	Jesús Cruces Pinto. Profesor Titular Amelia Caballero Borda. Profesora Titular Luis Pérez Jurado (desde Octubre 1995)
Colaboradores:	Jesús Solera García. Adjunto Clínico, Unidad de Genética Molecular del Hospital La Paz, Madrid.
Becaria Predoctoral:	María Cruz Martínez de Arrieta Martínez (desde Octubre 1994)
Personal de Apoyo:	Elena Candel Alvarez

### **Mutaciones de Hemofilia B**

(J. Solera, M. Magallón y A. Coloma)

La caracterización de nuevas mutaciones en el gen del Factor IX de la coagulación en familias españolas de pacientes de hemofilia B, tiene interés para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad, así como para proceder al diagnóstico molecular en familias en que los análisis de polimorfismos no son informativos. Estamos procediendo a una búsqueda sistemática de estas mutaciones mediante PCR de los exones del gen, análisis de polimorfismos en la conformación de la cadena sencilla (SSCP) y secuenciación directa de los fragmentos que muestran migración electroforética anormal. Hemos podido identificar de este modo 10 nuevas mutaciones puntuales en el gen del factor IX.

### **Atrofia Muscular Espinal: Mapa físico y genético de la región del cromosoma 5 que incluye el locus SMA**

(Ver resumen presentado por el Dr. Jesús Cruces Pinto)

### **Clonación posicional del gen de la Displasia Diastrófica**

(Colaboración realizada por A. Coloma en el laboratorio del Dr. Eric Lander)

Este trabajo condujo a la identificación del gen de la displasia diastrófica humana, que es una osteocondrodysplasia autosómica recesiva. El gen había sido localizado en el cromosoma 5 humano mediante análisis de ligamiento genético, y fue clonado posicionalmente con gran

precisión gracias al desequilibrio de ligamiento observado en familias de pacientes recogidas en Finlandia. La traducción de la secuencia identificada predice la estructura de un nuevo transportador de sulfato, cuya disfunción produce una inadecuada sulfatación de los proteoglicanos de la matriz del cartílago.

### **Caracterización de un gen humano que codifica neurogranina**

(Cruz Martínez de Arrieta, Juan Bernal y Antonio Coloma)

Mediante rastreo de una genoteca genómica humana con una sonda de cDNA de neurogranina (RC3) de rata, hemos aislado un cósmido que contiene la secuencia completa del gen humano que codifica neurogranina. Neurogranina es una proteína típicamente neuronal que es sustrato de la proteína quinasa C y que une calmodulina. La comparación de la secuencia de nucleótidos revela una notable conservación de este gen: los exones presentan un 80% de identidad respecto al del homólogo de rata, se conserva el número de intrones y los sitios de unión intrón/exón, así como muchas secuencias de unión de factores de transcripción en la región promotora.

### **Publicaciones**

Velasco, E., de la Puente, A., Cruces, J., Valero, C., García-Patiño, E., Castillo, I., Coloma, A., Moreno, F. and Hernández-Chico, C. (1994). Polymorphic dinucleotide repeats at the D5S1356 and D5S1357 loci (proximal to the SMA locus on 5q) and at the D7S1480 locus on the pericentromeric region of chromosome 7. *Human Molecular Genetics*, 3: 1441.

Hastbacka, J., de la Chapelle, A., Mahtani, M., Clines, G., Reeve-Daly, M., Daly, M., Hamilton, B., Kusumi, K., Trivedi, B., Weaver, A., Coloma, A., Lovett, M., Buckler, A., Kaitila, I. and Lander, E. (1994) The Diastrophic Dysplasia gene encodes a novel sulphate transporter: Positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78: 1073-1087

Bermejo, B., Prieto, J., Remacha, M., Coloma, A. and Ballesta, J. P.G. (1995) "Heterologous expression of the highly conserved acidic ribosomal phosphoproteins from *Dictyostelium discoideum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1263: 45-49.

Velasco, E., Valero, C., García, E. de la Puente, A., Cruces, J., San Millán, J.L., del Castillo, I., Coloma, A., Moreno, F. and Hernández-Chico, C. (1995) Isolation of novel microsatellites from the spinal muscular atrophy (SMA) candidate region on chromosome 5q and linkage analysis in Spanish SMA families. *Eur. J. Human Genet.* 3: 96-101

J. Cruces y A. Coloma (1995) Proyecto Genoma Humano: Situación y perspectiva. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología CSIC*, 10: 20-22.

### **Palabras clave**

Genética Humana, Proyecto Genoma, Clonación Posicional de Genes, Conservación de Secuencias, Genotecas Genómicas, Caracterización de Mutaciones, Enfermedades Hereditarias Recesivas

## **Regulación Hormonal del Metabolismo**

Investigador principal:	Juan Emilio Felú Albiñana, Catedrático de Universidad y Jefe de Sección de Endocrinología Experimental, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, Madrid.
Investigadores asociados:	Luisa López Alarcón, Jefe Adjunto de Bioquímica Experimental. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro (*Nota: Fallecida en 1995). Teresa Benlloch Marín, Pediatra Especialista de Area y Doctor Vinculado al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M. Gertrudis de la Fuente Sánchez, Profesora de Investigación del CSIC (jubilada, actúa como asesor científico)
Becario postdoctoral:	Julio César Sánchez Gutiérrez.
Becarios predoctorales:	María Josefa Muñoz Alonso. María del Carmen González Lechuga. Juan José Carrillo de la Fuente. Andrés Esteban Gamboa.
Personal de apoyo:	Begoña Samper Villanueva Isabel García-Ripoll Catalán

### **Sistema de señalización celular dependiente de glucosil-fosfatidilinositol y resistencia a la insulina.**

(Juan Emilio Felú Albiñana, Julio César Sánchez Gutiérrez, María del Carmen González Lechuga, Juan José Carrillo de la Fuente, Andrés Esteban Gamboa).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de un mecanismo de señalización celular dependiente de glucosilfosfatidil inositol por el que la insulina podría ejercer algunas de sus acciones. La hidrólisis de este compuesto en respuesta a la acción de la insulina, genera un inositol-fosfato glicano capaz de reproducir las acciones de esta hormona, habiendo sido considerado como un posible segundo mensajero de esta hormona.

En el desarrollo de esta línea de investigación, previamente habíamos demostrado que en células hepáticas obtenidas de ratas sometidas a distintas situaciones de resistencia a insulina (tratamiento con glucocorticoides, diabetes por administración de estreptozotocina o envejecimiento) se produce una disminución de los niveles celulares de glucosilfosfatidil inositol, una reducción de la hidrólisis de este compuesto en respuesta a la insulina, una caída de la captación de inositol-fosfato glicano por parte de las células hepáticas y un bloqueo de la capacidad de este compuesto para estimular la síntesis de glucógeno. Estos mismos cambios han sido también observados en células hepáticas obtenidas de ratas obesas Zucker (fa/fa), modelo de obesidad genéticamente determinada. Asimismo, hemos estudiado el mecanismo molecular por el que la gluconeogénesis hepática en la rata obesa Zucker (fa/fa) es resistente a la modulación por glucosa e insulina.

## **Mecanismo de acción de los hipoglucemiantes orales tipo sulfonilureas en tejidos extrapancreáticos.**

(Juan Emilio Felú Albiñana, Luisa López Alarcón, María Josefa Muñoz Alonso, Begoña Samper Villanueva).

Nuestro grupo ha demostrado que los hipoglucemiantes tipo sulfonilurea son capaces de inhibir la formación hepática de glucosa bloqueando la gluconeogénesis. Esta acción está mediada por el aumento de la concentración celular de fructosa 2,6-difosfato, en parte debida a la activación de la glucógeno fosforilasa. Recientemente hemos demostrado que -al igual que ocurre en la célula beta pancreática- las sulfonilureas son capaces de incrementar la concentración citosólica de  $Ca^{++}$  en hepatocitos aislados de rata y en miocitos BC3H1 por estimulación de la entrada de  $Ca^{++}$  desde el medio extracelular, lo que se acompaña de una activación de la glucógeno fosforilasa. También hemos llevado a cabo un estudio comparativo de las acciones de la glibenclamida y de su análogo meglitinida -carente del grupo sulfonilurea- sobre el metabolismo hepático, demostrando que la modulación de los flujos celulares de  $Ca^{++}$  por la glibenclamida no depende de la presencia del grupo sulfonilurea.

## **Diagnóstico de enzimopatías relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.**

(Teresa Benlloch Marín, Gertrudis de la Fuente Sánchez, Isabel García-Ripoll Catalán)

Durante este periodo hemos seguido funcionando como centro de referencia para hospitales de diferentes ciudades del país, para el diagnóstico de enfermedades metabólicas hereditarias relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, Se han realizado estudios con fines diagnósticos sobre glucogenosis hepáticas, musculares y generalizadas, sobre alteraciones del metabolismo de la galactosa (deficiencia en galactokinasa y galactosemia), así como sobre alteraciones del metabolismo de la fructosa (fructosuria esencial e intolerancia a la fructosa)

## **Publicaciones.**

Sánchez-Gutierrez, J.C., Sánchez-Arias, J.A., Valle, J.C., Guadaño, A., Samper, B., Mato, J.M., Felú, J.E. (1994): "Insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats: changes in the glycosyl-phosphatidylinositol signalling system in isolated heparocytes" *Endocrinology* 134: 1485-1492 .

Sánchez-Gutierrez, J.C., Sánchez-Arias, J.A., Lechuga, M.C.G., Valle, J.C., Samper, B., Felú, J.E. (1994): "Decreased responsiveness of basal gluconeogenesis to insulin action in hepatocytes isolated from genetically obese (fa/fa) Zucker rats" *Endocrinology* 134: 1868-1873.

López-Alarcón, L., Muñoz-Alonso, M.J., Guijarro, C. y Felú, J.E. (1995) "Modulation of glycogen phosphorylase levels by glibenclamide and meglitinide in isolated rat hepatocytes: A comparative study". *Metabolism: Clinical and Experimental*. 44: 1000-10007.

Sánchez-Gutiérrez, J.C., Sánchez-Arias, J.A., Samper, B., y Felú, J.E. (1995) "Impairment of the modulation of hepatic gluconeogenesis by glucose in the genetically obese (fa/fa) rat". *Endocrinology* 136:1877-1884.

**Tesis doctorales.**

Juana Olea García: "Modulación hormonal de la vía glucolítica y estudio de la influencia de las sulfonilureas sobre la secreción de ácido y pepsinógeno en glándulas gástricas aisladas de conejo". Directores: Juan Emilio Felú Albiñana e Irma Rossi Raviolo. Facultad de Ciencias, Univ. Autónoma de Madrid, 1994.

Julio Cesar Sánchez-Gutiérrez: Resistencia a la insulina y modulación de la gluconeogénesis hepática en la rata obesa (fa/fa). Director: Juan Emilio Felú Albiñana. Facultad de Ciencias, Univ. Autónoma de Madrid, 1994.

**Palabras clave.**

Glucosil-fosfatidilinositol, resistencia a la insulina, sulfonilureas,  $Ca^{++}$ , hepatocitos, enzimopatías.

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

Investigador principal : Claudio Fernández de Heredia Adánez. Profesor de Investigación .

Becarios predoctorales : Julián Nevado Blanco.  
Antonio Díaz García. (hasta enero de 1995)  
Elena Fernández Centeno (hasta enero de 1995)

Personal de apoyo : María Asunción Navarro Palanca.

### **Transporte de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae*.**

(Julián Nevado Blanco y Claudio F Heredia)

A pesar de la abundancia de trabajo sobre los mecanismos de transporte de hexosas a través de la membrana plasmática de levadura, existía una gran controversia sobre si el transporte del azúcar implica fosforilación del mismo o es independiente de su fosforilación. Este trabajo aborda este problema. Hemos desarrollado un abordaje experimental que permite fácilmente diferenciar estas dos posibilidades. Se basa en el hecho de que manosa tritiada en el átomo de carbono en posición 2, pierde la marca tan pronto como es fosforilada por la célula debido a su rápida transformación en fructosa 6-fosfato. Hemos demostrado de forma inequívoca que el transporte de hexosas en levadura es independiente de la fosforilación de las mismas, y que esta fosforilación tiene lugar después que el azúcar ha sido transportado al interior de la célula. Se estudian también otras características del transporte, utilizando este nuevo abordaje experimental.

### **Sensibilidad de la glicolisis a inhibición por glucosamina.**

(Julián Nevado Blanco y Claudio F Heredia)

Hemos encontrado que la inhibición por glucosamina de la utilización de hexosas por *Saccharomyces cerevisiae* se induce por crecimiento de las células en medios con galactosa como única fuente de carbono. La intensidad de la inhibición va en paralelo con la inducción de los enzimas de la vía de utilización de galactosa. Estos hallazgos contrastan con el hecho de que la glucosamina es sustrato de los sistemas de transporte y fosforilación de glucosa pero no de los correspondientes de galactosa. La inhibición por glucosamina es dependiente de pH, su intensidad está relacionada con el grado de fosforilación de la glucosamina y no es consecuencia de una disminución de ATP en la célula. Derivados fosforilados de glucosamina acumulados en la célula, inhiben el transporte de glucosa y manosa solamente cuando las células se crecen en galactosa pero no en glucosa o etanol. Sin embargo, la inhibición del transporte no es suficiente para dar cuenta de todas las características de esta inhibición. Los cambios inducidos por crecimiento de las células con galactosa, que las hacen sensibles a glucosamina están bajo el control de los genes *gal80* y *gal4* (trabajo en prensa).

## **Síntesis de nucleósidos 2' fosfato.**

(Antonio R Díaz, Elena Fernández y Claudio F. Heredia)

Hemos terminado el trabajo de caracterización de la 2', 3' nucleótido fosfohidrolasa de *Artemia* (trabajo en prensa) y continuado con la caraterización del enzima análogo en *Fusarium culmorum* , así como de la exploración en este organismo de otras actividades fosfodiesterasas activas sobre nucleótidos 2',3' monofosfato y del estudio del control de su expresiòn.

## **Publicaciones**

Nevado, J., Navarro, A. and Heredia, C.F., (1994) Transport of hexoses in yeast. Re-examination of the sugar phosphorylation hypothesis with a new experimental approach. *Yeast* 10, 59-65

## **Tesis doctoral**

Antonio Rafael Díaz García. Síntesis de nucleósidos 2'-monofosfato. Caracterización de una actividad 2',3'- nucleótido cíclico 3'- fosfodiesterasa en *Artemia franciscana*. Director: Claudio F.Heredia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Madrid. 1994..

Julián Nevado Blanco. Relación funcional entre las vías constitutiva e inducible de utilización de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae*. Director: Claudio F.Heredia. Facultad de Ciencias Biológicas.Universidad Autónoma de Madrid. 1995

## **Palabras Clave**

*Saccharomyces*, levadura, glicolisis, transporte hexosas, glucosamina. nucleótido fosfohidrolasa, *Artemia*, *Fusarium*.

## **Mecanismos de resistencia celular a Metotrexato en LLA. Enzimología de las vías de recuperación de purinas en diferenciación y estados patológicos .**

Investigadora Principal:	Pilar Llorente, Investigadora Científica
Becaria postdoctoral:	Celia Montero
Becaria predoctoral:	Ana Abad
Personal de apoyo:	Luisa Argomániz
Investigadores asociados:	Vicente Arán, Colaborador Científico; Instituto Química Médica (CSIC) Margarita Menéndez, Colaborador Científico; Instituto Rocasolano (CSIC) Javier Crespillo, Director Técnico Roche - Andreu

### **Mecanismos de resistencia celular a Metotrexato (MTX) : Inhibición de la poliglutamilacion por metabolitos de la hidrólisis de Fólico y MTX .**

( Pilar Llorente, Celia Montero, Ana Abad y Luisa Argomániz, en colaboración con Vicente Arán, Instituto Química Médica del CSIC)

La resistencia a fármacos antineoplásicos y su toxicidad, son las principales causas del fracaso de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer. La identificación de nuevos "*blancos*" celulares de acción farmacológica y el diseño de fármacos capaces de prevenir o revertir la resistencia, constituyen un punto de partida de nuevas vías terapéuticas . Los antifolatos están entre los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento del cáncer. Los folatos naturales y antifolatos clásicos, como el MTX, son convertidos en derivados poliglutamados , fundamentales en la acción citotóxica de los antifolatos , por la acción de la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS). Por otra parte, se ha relacionado el grado de resistencia celular a antifolatos con un incremento de la actividad folilpoliglutamato hidrolasa. (FPGH )

Nuestro objetivo fundamental es la caracterización, el diseño y el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos utilizando como "*blanco*" la inhibición de la enzima FPGS en células de leucemia murina L-5178-Y y en las respectivas sublíneas resistentes a MTX. En el estudio se utilizaron dos abordajes diferentes: 1) Síntesis y mecanismos de inhibición de derivados de pterina , y los correspondientes de MTX , sobre la FPGS de las muestras biológicas objeto de estudio. Basándonos en los resultados , previamente obtenidos en este laboratorio , del efecto inhibitor de algunos derivados de pterina sobre la actividad FPGS de células de LLA ( L-5178-)Y , se han sintetizado los amino derivados correspondientes , y estudiado su acción sobre la enzima . 6-carboxilato pterina, 6-metil pterina y 6-hidroximetil pterina, posibles metabolitos producto de la hidrólisis del ácido fólico y / o MTX inhiben la actividad enzimática con una  $K_i$  del orden  $\mu$ molar. , y , a diferencia de los clásicos inhibidores de FPGS descritos , no contienen la molécula de glutámico terminal por lo que, al ser más lipofílicos, atraviesan fácilmente la membrana celular por difusión pasiva. 2) Efecto sobre la actividad FPGS , de las muestras biológicas utilizadas , de los productos de hidrólisis

intracelular de folato y MTX. Puesto que se conoce la existencia de una enzima hidrolítica de folato y algún producto catabólico pterin-derivado ha sido detectado en el medio de crecimiento de células cancerígenas estamos aislando, caracterizando y estudiando el efecto, sobre la actividad FPGS, de los productos del metabolismo intracelular, " *in vivo* " del ácido fólico y del MTX.

### **Metabolismo de purinas en pacientes con síndrome de Lesch-Nyhan (HGPRT<sup>-</sup>)**

( Pilar Llorente, Javier Crespillo, Ana Abad y Luisa Argomániz)

El síndrome de Lesch-Nyhan, deficiencia en la actividad de la enzima HGPRTasa está asociado a desórdenes neurológicos, cuyo mecanismo preciso aún no se conoce, así como cambios en el metabolismo de purin nucleótidos.

Previamente hemos demostrado la síntesis PRPP-dependiente de los nucleósidos inosina y guanosina en eritrocitos de pacientes deficitarios en HGPRTasa y los estudios últimamente realizados apoyan, que dicha síntesis es debida a la acción secuencial de una ferrosfosfatasa ( resistente a tartrato ) y la purin nucleótido fosfatasa ( PNP )..

Experimentos realizados con eritrocitos controles (HPRT<sup>+</sup>), simulando "*in vitro*" la deficiencia de HGPRT, muestra que esta vía metabólica está normalmente presente en los eritrocitos, detectándose "*in vivo*" únicamente cuando la enzima HGPRTasa no es funcionante, por lo que puede considerarse una ruta alternativa para la recuperación de hipoxantina y/o síntesis de nucleótidos purínicos en estos pacientes, con la consiguiente disminución de las alteraciones neurológicas, que les afectan.

### **Estudio de las propiedades fisicoquímicas de las fosforribosil transferasas purínicas: Estabilidad térmica de la HGPRT de *Artemia***

(Pilar Llorente, Celia Montero, Margarita Menéndez y Luisa Argomaniz )

El objetivo de este trabajo es el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las enzimas de las vías de recuperación de purinas, HGPRT y APRT, en *Artemia* y sus posibles cambios durante el desarrollo.

Demostrada la estabilidad térmica de estas proteínas y la mayor resistencia a la inactivación por calor de la HGPRT, respecto a la APRT, de quistes de *Artemia*, hemos investigado el efecto de la temperatura sobre la actividad, máxima a 70° C, y estabilidad de la enzima, así como la función de los substratos, PRPP:Mg<sup>++</sup>, en su termoestabilidad. Por lo tanto, las cinéticas de la irreversible desnaturalización térmica de la enzima se han caracterizado con y sin PRPP:Mg<sup>++</sup> en orden a esclarecer el mecanismo correspondiente. La importancia de este mecanismo en sistemas biológicos radica en que es fácilmente regulado por la concentración de ligandos en el sistema.

El hecho de que una actividad parcial de la enzima es retenida en la forma intermediaria formada durante la desnaturalización térmica puede reflejar un mecanismo protector en *Artemia* que permite "sobrevivir" la HGPRT bajo condiciones de "*stress*" térmico.

### **Publicaciones**

Montero, C., Abad, A., Argomániz, L. and Llorente, P. (1994) Pteridine analogs as inhibitors of FPGS from L-5178-Y cells. *Anticancer Research* 15: 5, 1666.

Montero, C., Duley, J., Fairbona, L., Bride, M., Michaeli, W. and Morgan, G. (1995) Demonstration of induction of erythrocytes IMP-DH activity in ribaverine treated patients

using a HPLC method. Clin. Chim. Acta, 238, 169.

### **Tesis doctoral**

Crepillo Calleja, L. Javier. Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 1994. Estudio de la síntesis de nucleósidos purínicos y de la actividad APRTasa en eritrocitos de pacientes con deficiencia de HGPRTasa.

### **Palabras clave.**

Leucemia, MTX., resistencia celular, poliglutamilación, L-5178-Y . Fosforribosiltransferasas, termorresistencia, Artemia, Nucleósidos, ferrofosfatasas, PNP, síndrome de Lesch-Nyhan.

## **Niveles de antioxidantes no enzimáticos en sangre y arteria en relación con el riesgo cardiovascular**

Investigadora principal: María Rosa de Sagarra Conde, Profesora Titular

### **Ubiquinol en lipoproteínas de baja densidad plasmáticas y tejidos humanos**

Angeles Zapata Ferrer - Adjunto de Bioquímica del Hospital La Paz

Cristina Grande Aragón - Adjunto de Bioquímica del Hospital La Paz

José Manuel Hernández García - Profesor Titular de Ginecología - Universidad Complutense

Montserrat Soriano Marín - Profesora Titular Interina - Universidad Autónoma de Madrid

Se ha asociado la presencia de enfermedad cardiovascular con la disminución de defensas frente al stress oxidativo. Entre estas defensas se encuentra el ubiquinol, que, además de formar parte de la cadena respiratoria mitocondrial, se encuentra en otras estructuras lipídicas del organismo, celulares y extracelulares (lipoproteínas plasmáticas). Se sabe que la oxidación de las lipoproteínas aumenta el riesgo de aterosclerosis e hipertensión. En la mujer postmenopáusica aumenta la prevalencia de hipertensión y dislipemia, por lo que existe un importante número de factores de riesgo cardiovascular asociados en esta etapa de su vida, de forma que la incidencia de enfermedad cardiovascular aumenta. Hemos creído pues importante conocer si el cambio hormonal experimentado en la menopausia está relacionado con disminución del contenido de antioxidantes, en particular ubiquinol, lo que justificaría, al menos en parte, el incremento de riesgo cardiovascular en la menopausia. En primer lugar se pretendía analizar el patrón lipídico del plasma de pacientes postmenopáusicas con riesgo cardiovascular, así como analizar en lipoproteínas de baja densidad la composición en cuanto a lípidos, apolipoproteínas, antioxidantes y resistencia a la peroxidación. No hemos hallado datos en la bibliografía sobre la concentración de coenzima Q en vasos sanguíneos y pensamos que puede influir en la susceptibilidad de las arterias al desarrollo de hipertensión y aterosclerosis. Otro parámetro era pues el nivel de coenzima Q en el tejido vascular de mujeres postmenopáusicas. Para ello contábamos con la colaboración de miembros del Departamento de Bioquímica del hospital La Paz, que realizarían las extracciones y análisis rutinarios de lípidos sanguíneos y con el Dr. Hernández García, Jefe del Departamento de Ginecología del hospital Clínico San Carlos, que nos suministraría las muestras de arteria procedentes de cirugía. Para poder valorar ubiquinol en estas muestras, y dado que se trata de una sustancia extraordinariamente lábil, hemos desarrollado un medio de conservación en el que los niveles de ubiquinol se mantienen como mínimo 48 horas.

### **Publicaciones**

Marín, J, Alonso, M.J., Salaices, M. y de Sagarra, M.R., (1995) Técnicas utilizadas para estudiar diversos aspectos del lecho vascular cerebral, en "Bases Experimentales para el Estudio del Sistema Nervioso", Tomo II (Armengol Butrón de Mújica, J.A. y Miñano Sánchez, F.J., Eds.), pp. 391-418, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

### **Palabras clave**

arteria, coenzima Q, lipoproteínas, radicales libres, riesgo cardiovascular, d- $\alpha$ -tocoferol, ubiquinol, Vitamina E.

## Metabolismo y función de dinucleósido polifosfatos

Investigadores principales:	Antonio Sillero, Catedrático de Universidad María Antonia Günther Nonell, Investigadora Científica Eulalio Zaera Jimeno, Colaborador Científico
Profesores visitantes:	Rui Fontes (01/01/94 - 30/09/95), Departamento de Fisiología Facultad de Medicina, Universidad de Porto, Portugal Agostinho Franklim Marques. (01/02/94-30/03/94 y 01/01/95-31/07/95). Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Porto, Oporto, Portugal Alexander Biryukov (25/11/94-31/01/95). Academia Rusa de Ciencias, Moscú, Rusia.
Becarios predoctorales:	Begoña Ortiz Santodomingo (01/01/94-29/02/94) Mercedes del Valle Sanz (01/01/94-31/12/94) Amparo Torrecilla Rojas (01/01/94-30/09/94)
Personal de apoyo:	Ana Isabel de Diego Erasun Olga Valverde González (01/04/94-01/04/95) Jean-Christophe Seghezzi. (01/06/94-31/07/94). Ecole Nationale de Chemie, Physique, Biologie, Paris, Francia . Juan Ramón Serrano Valenciano (01/06/95-31/12/95)
Estudiantes Programa Erasmus	Irene Sofia Leal. (01/03/94-31/07/94) Facultad de Ciencias, Universidad de Porto, Oporto, Portugal . Claudio Gambaretto. (01/11/94-15/07/95) Facultad de Biología, Universidad de Parma, Parma, Italia

## Metabolismo y función de dinucleósido polifosfatos (Np<sub>4</sub>N)

(M.A.Günther, E. Zaera, B.Ortiz, A. Guranowski, M del Valle, A. de Diego y A. Sillero)

a) Como continuación de la búsqueda de enzimas capaces de sintetizar Np<sub>4</sub>N se ha visto que la Acetil-CoA sintetasa de levadura sintetiza adenosina 5'-tetrafosfato (p<sub>4</sub>A), adenosina 5'-pentafosfato (p<sub>5</sub>A) y, con menor eficacia, otros Np<sub>4</sub>N; b) Utilizando la luciferasa de luciérnaga, (EC 1.13.12.7) se han desarrollado métodos para la síntesis de diadenosina tetrafosfato (Ap<sub>4</sub>A) y de adenosina 5'-tetrafosfato 5'-nucleósido (Ap<sub>4</sub>N) marcados radiactivamente en los residuos nucleosídicos o en la cadena interna de fosfatos; c) La síntesis de Ap<sub>4</sub>A por la luciferasa no requiere la presencia de oxígeno; d) Se ha aislado una adenilato deaminasa inespecífica de caracol (*Helix pomatia*) capaz de convertir Ap<sub>4</sub>A en diinosina tetrafosfato (Ip<sub>4</sub>I); e) Los embriones del crustáceo *Thamnocephalus platyurus* contienen concentraciones milimolares de diguanosina tetrafosfato; f) Se ha hecho un estudio detallado de la concentración de Ap<sub>4</sub>A, ATP y catecolaminas en medula adrenal, gránulos cromafines y células cromafines de bovino.

## **Metabolismo de nucleótidos purínicos**

(A. Sillero, S. Bleish, A. Torrecilla, A. de Diego y M. A. Günther)

Se ha medido la capacidad de los sobrenadantes de 105.000xg de hígado de rata para sintetizar ácido úrico a partir de bases, nucleósidos y nucleótidos purínicos

## **Cinética enzimática**

(A. Sillero, R. Fontes y J. M. Ribeiro)

a) Se ha aplicado el modelo del reservorio a los distintos tipos de inhibición enzimática, tanto parciales como totales; b) Se ha analizado la relación entre la concentración de un compuesto que inhibe al 50 % ( $I_{50}$ ) y las constantes cinéticas de una reacción enzimática; c) Se ha hecho una representación tridimensional de la inhibición enzimática, que puede tener una utilidad diagnóstica sobre el tipo de inhibición.

## **Publicaciones**

Ribeiro, J. M., Fontes, R. and Sillero, A. (1994) Enzyme inhibition as visualized with the reservoir model: relationships between  $I_{50}$  and inhibition constant(s) of an enzyme inhibitor. *Comput. Biol. Med.* 24: 129-144.

Sillero, M. A. G., De Diego, A., Cerdán, S., Criel, G., and Sillero, A. (1994) Occurrence of millimolar concentrations of guanosine (5')tetraphospho(5') guanosine (Gp<sub>4</sub>G) in encysted embryos of *Thamnocephalus platyurus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B :41-45.

Guranowski, A., Günther Sillero, M. A. and Sillero, A. (1994) Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J. Bacteriol.* 176 : 2986-2990.

Fontes, R., Ribeiro, J. M. and Sillero, A. (1994) A tridimensional representation of enzyme inhibition useful for diagnostic purposes. *J. Enzyme Inhibition* 8: 73-85.

Sillero, M. A. G. , Del Valle, M., Zaera, E., Michelena, P., Garcia, A. G. and Sillero, A. (1994) Diadenosine 5'-5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. *Biochimie*, 76: 404-4096.

Bleisch, S., Günther Sillero, M. A., Torrecilla, A. and Sillero, A. (1994) Uric acid synthesis by rat liver supernatants from purine bases, nucleosides and nucleotides. Effect of allopurinol. *Cell Biochem. Function*, 12: 237-245.

Garrido, S., Zaera, E., Torrecilla, A., Sillero, A. y Günther Sillero, M.A. (1995). Labeled adenosine (5') tetraphospho (5') adenosine (Ap<sub>4</sub>A) and adenosine (5') tetraphospho (5') nucleoside (Ap<sub>4</sub>N). Synthesis with firefly luciferase. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 30: 191-198.

Ortiz, B., Fernández, V.M., Günther Sillero, M.A. y Sillero, A. (1995) Influence of oxygen, dehydroluciferin, luciferin and 6'-ethyl-luciferin on the synthesis of adenosine (5') tetraphospho (5') adenosine (Ap<sub>4</sub>A) by firefly luciferase. *J. Photochemistry and Photobiology B : Biology* 29: 33-36.

Guranowski, A. Starzynska, Günther Sillero, M.A. y Sillero, A. (1995) Conversion of adenosine (5') oligophospho (5') adenosines into inosine (5') oligophospho (5') inosines by non-specific adenylyate deaminase from the snail *Helix pomatia*. *Biochim. Biophys. Acta* 1243: 78-84.

### **Tesis doctorales**

Begoña Ortiz Santodomingo. Síntesis de dinucleosido-polifosfatos catalizada por luciferasa de luciérnaga. Directores: Antonio Sillero y María Antonia Günther. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares. 1994.

Mercedes del Valle Sanz. Ligando endógeno de canales de calcio en cerebro bovino; coliberación y contenido de catecolaminas, diadenosina tetrafosfato y ATP en células cromafines. Directores: María Antonia Günther y Antonio Sillero. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1994.

### **Palabras Claves**

Dinucleósido polifosfatos, Diadenosina tetrafosfato; *Thamnocephalus platyurus*, Acetil-CoA sintetasa, Inhibición enzimática, Luciferasa, *Helix pomatia*, adenosina 5'-tetrafosfato, Médula adrenal bovina, Artemia.

**Departamento de Regulación  
de la Expresión Génica.**

## **Paramiosina y otras proteínas musculares en *Drosophila*: Biología molecular, análisis bioquímico y funcional**

Investigadora principal: Margarita Cervera. Profesora Titular

Investigador Asociado: R.Marco

Becario postdoctoral: Patrick Benoist.

Becarios predoctorales: Miguel Maroto Sanchez.  
Juan Arredondo Lamas

### **Análisis funcional de los promotores que regulan la expresión del gen de la Paramiosina/miniparamiosina *in vitro* e *in vivo*.**

(J. Arredondo, R. Marco y M. Cervera)

Dentro del estudio de los mecanismos que regulan la transcripción durante el desarrollo de este gen se está llevando a cabo el estudio de los dos promotores que la controlan. Se han analizado por retraso en gel las cajas E y el único sitio MEF-2 existente en estos promotores que es exclusivo del promotor de la PM. El sitio MEF-2 une *Dmef-2* pero de todas las cajas E analizadas solo una de ellas cerca de un motivo de unión a MEF-2, une *nau*. Recientemente se ha sugerido por diferentes grupos que la interacción de MyoD y MEF-2 era necesaria para activar la transcripción. La posible importancia de esta región ha hecho que se haya analizado en ensayos de cotransfección por CAT. El análisis *in vivo* de las propiedades funcionales de los promotores se ha realizado por transferencia génica. El abordaje que se ha comenzado a emplear para este análisis *in vivo* es el estudio de la expresión del gen de la  $\beta$  galactosidasa unido a diferentes regiones promotoras del gen. Estas regiones que podrían ser importantes para su expresión específica en el tejido muscular, o dentro del músculo para su expresión en un tipo determinado de músculo o fibra muscular o simplemente regulando la cantidad. Este método permite generar moscas transformadas en la línea germinal usando la técnica de transformación mediada por elementos P.

### **Regulación de la expresión de las isoformas de la TnT por el análisis del promotor. Búsqueda de regiones activadoras en el promotor del gen de la TnT.**

(Patrick Benoist, J. A. Mas, R. Marco y M. Cervera)

De forma análoga a lo ya realizado con la paramiosina se ha iniciado la obtención de clones genómicos de *Drosophila melanogaster* y *virilis* que cubran la región promotora del gen de la TnT, usando para ello el cDNA previamente obtenido en nuestro laboratorio. Tras su secuenciación, se identificarán las secuencias potencialmente reguladoras comunes en ambos promotores. Se procederá de forma semejante a lo descrito en el apartado anterior, a realizar el mismo tipo de análisis con estos promotores a fin de identificar los elementos potencialmente de control, así como los posibles factores de transcripción que los regulan. La disponibilidad de mutantes en este gen facilitará este análisis, aunque no puede descartarse que sea necesario obtener nuevos mutantes, ya que los identificados son específicos de los músculos de vuelo.

## **Publicaciones**

M. Maroto, J.J. Arredondo, M. San Román, R. Marco & M. Cervera (1995). Analysis of the Paramyosin/Miniparamyosin Gene: Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct Paramyosin Isoform, widely distributed in invertebrates. *J. Biol. Chem.*, 270, 4375-4782

V. Andres, M. Cervera & V. Mahdavi.(1995) Determination of the consensus binding site for MEF expressed in muscle and brain. *J. Biol. Chem.*, 270, 23246-23249.

## **Tesis doctoral**

La estructura del gen de la Paramiosina/miniparamiosina de *Drosophila melanogaster*. Caracterización de la miniparamiosina. Miguel Maroto Sanchez. Apto cum laude. Febrero 1994.

## **Palabras Clave**

Músculo, proteínas estructurales, *Drosophila*, análisis de promotores y función

## **Estudio de genes humanos responsables de enfermedades neuromusculares hereditarias. Caracterización de secuencias centroméricas humanas**

Investigador principal:	Jesús Cruces Pinto, Profesor Titular
Investigadores asociados:	Antonio Coloma Jerez Amelia Caballero Borda Luis Pérez Jurado (desde octubre de 1995)
Investigadores visitantes	Marina Inmaculada Garín Ferreira. Universidad de Alcalá de Henares (desde junio de 1995)
Colaboradores:	Concepción Hernández y Felipe Moreno, Unidad de Genética Molecular del Hospital "Ramón y Cajal" (Madrid)
Becaria predoctoral:	Aránzazu de la Puente Rodríguez

Las enfermedades neuromusculares constituyen el principal grupo de enfermedades hereditarias que afectan a los humanos. Nuestro grupo se ha centrado en 2 de ellas. Por un lado, en la atrofia muscular espinal (SMA), cuyos individuos afectados presentan distintos grados de degeneración de las células de las astas neuronales anteriores. Esta enfermedad es, después de la fibrosis quística, la segunda más frecuente en humanos: 1 de cada 8-10.000 nacimientos vivos. Y, por otro lado, en la distrofia muscular recesiva humana homóloga de la mutación "rotated" de *Drosophila*. Hasta la fecha, este gen de *D. melanogaster* no se corresponde con ninguno de los genes caracterizados para diferentes distrofias recesivas humanas, pudiendo corresponder a cualquiera de otras distrofias aún sin determinar. Además, estamos estudiando las secuencias centroméricas humanas, con la finalidad de conocer las secuencias necesarias para la formación de un centrómero humano funcional, y poder producir finalmente cromosomas artificiales de mamífero (MACs) como posibles vehículos para introducir genes exógenos en células humanas, y su aplicación en terapia génica.

### **Atrofia Muscular Espinal: Mapa físico y genético de la región del cromosoma 5 que incluye el locus SMA**

(A. de la Puente, J. Cruces, A. Coloma )

Se ha seguido caracterizando la región donde se localiza el gen responsable de la atrofia muscular espinal en 5q11-14. Mediante electroforesis en campo pulsado se ha realizado un mapa de restricción parcial de la zona, analizando 10 YAC solapantes de la misma, y que abarcan 1,5 Mb. La dificultad ha sido enorme debido a ser una región con muchas subregiones repetidas, lo que hace que los YAC sean inestables y sufran reorganizaciones. Se han localizado varios nuevos marcadores polimórficos muy útiles para el estudio de la zona y sobre todo para el diagnóstico prenatal y de portadores de la enfermedad. Con estos y otros marcadores se ha realizado un estudio de las familias españolas con atrofia muscular espinal.

## **Estudio de las secuencias alfoide del centrómero del cromosoma 7 humano**

(A. de la Puente, M. Garín, A. Caballero, A. Coloma y J. Cruces)

Se ha seguido con el estudio del final de las secuencias centroméricas del cromosoma 7 clonadas en el YAC 311.H5, con la finalidad de conocer las secuencias necesarias para constituir un centrómero humano funcional y producir cromosomas artificiales de mamífero (MACs). Así, se han localizado 2 nuevas familias de repeticiones de secuencias alfoide, diferentes de las D7Z1 y D7Z2 previamente caracterizadas en dicho cromosoma. Una de ellas (D7Z5) se localiza en un extremo del YAC y se extiende alrededor de 22 kb. La otra, D7Z6, se localiza a 100 kb de la anterior y es más pequeña: 10kb. El YAC completo se ha subclonado en cósmidos, y su estudio ha revelado la existencia de otras repeticiones: "MER 22", que hasta ahora sólo se habían descrito en los cromosomas 4 y 19. Mediante FISH estas secuencias alfoide del YAC se localizan hacia el brazo "p" del cromosoma 7. Asimismo, se ha localizado una "isla CpG" en el YAC 311.H5. Se ha aislado el cósmido que la contiene, y comprobado que detecta un mRNA de 6 kb de placenta. Actualmente seguimos caracterizando las secuencias alfoide y MER 22, así como el gen responsable del mensajero de 6 kb de placenta.

## **Caracterización del gen humano homólogo del gen "rotated" de *Drosophila***

(J. Cruces y L. Pérez-Jurado)

La mutación en el locus "rotated" (rt) de *Drosophila* produce la rotación helicoidal del abdomen, mostrando defectos en el desarrollo embrionario muscular. Se comporta como una mutación recesiva que produce individuos poco viables. Este tipo de mutación podría correlacionarse con distrofias recesivas humanas. Utilizando el cDNA clonado de este gen, y utilizando los bancos de datos del genoma humano se ha localizado un cDNA incompleto, que contiene las 1,8 kb finales del extremo 3' final. Este fragmento de cDNA detecta dos mensajeros de 3,0 y 4,2 kb que se expresan preferentemente en músculo estriado, corazón, cerebro e hígado. Mediante PCR de un pequeño fragmento de la secuencia 3' final se ha detectado que dicho mensajero procede de un gen localizado en el cromosoma 9, utilizando para ello el panel de DNA de células híbridas roedor-humano. Actualmente se está rastreando la genoteca de megaYACs del CEPH para localizar los YACs que contienen dicho gen y realizando FISH para localizar la banda cromosómica en la que se encuentra el mismo.

## **Publicaciones**

Velasco, E., de la Puente, A., Cruces, J., Valero, C., García-Patiño, E., Castillo, I., Coloma, A., Moreno, F. and Hernández-Chico, C. (1994). Polymorphic dinucleotide repeats at the D5S1356 and D5S1357 loci (proximal to the SMA locus on 5q) and at the D7S1480 locus on the pericentromeric region of chromosome. *Human Molecular Genetics*, 3: 1441.

Kuo, W-L., Stafford, D., Cruces, J., Gray, J. and Solera, J. (1994). Chromosomal localization of the gamma-glutamyl-carboxylase gene at 2p12. *Genomics*, 25: 746-748.

E. Velasco, C. Valero, E. García, A. de la Puente, J. Cruces, J.L. San Millán, I. del Castillo, A. Coloma, F. Moreno and C. Hernández-Chico. (1995). "Isolation of microsatellites from the Spinal Muscular Atrophy (SMA) candidate region on chromosome 5q and linkage

analysis in spanish SMA families". European Journal of Human Genetics", 3: 96-101.

J. Cruces y A. Coloma (1995). "Proyecto Genoma Humano: Situación y perspectivas". Fronteras de la Ciencia y la Tecnología CSIC, 10: 20-22.

### **Palabras clave**

Proyecto Genoma Humano, enfermedades hereditarias, Atrofia muscular espinal, distrofias musculares recesivas, secuencias alfoide, centrómeros, MER 22, islas CpG, YACs, MACs, microsatélites marcadores

## **Regulación de la expresión de los genes mitocondriales durante el desarrollo**

Investigadora principal:	Carmen García Vallejo, Colaboradora Científica
Becarios postdoctorales:	José Alberto Carrodegua Villar (hasta Diciembre 1994) Jorge Santiago Martín (hasta Noviembre 1994)
Personal de apoyo:	Mercedes López López (hasta Noviembre 1994) Ana María Seguido de la Fuente (desde Febrero 1995)

### **Expresión de los genes mitocondriales durante el desarrollo de *Artemia***

(C.G. Vallejo y M. López, en colaboración con el doctor R. Garesse)

Hemos concluido el estudio de las bases moleculares de la activación de un orden de magnitud de las actividades enzimáticas mitocondriales que se observa inmediatamente después de la reanudación del desarrollo de *Artemia*. La activación enzimática mitocondrial se correlaciona con a) cambios profundos en la morfología mitocondrial, b) un aumento de 5 veces en la cantidad de la subunidad  $\beta$   $H^+$ -ATP sintetasa, utilizada como marcador mitocondrial, c) un aumento relativo de hasta 20 veces de los niveles de los RNAs mensajeros mitocondriales, mientras que los de los ribosómicos apenas aumentan. En contraste, los niveles de DNA mitocondrial no cambian en las primeras 20 horas, aunque luego se replica acoplado a la replicación del DNA nuclear. Los datos indican que el aumento en función mitocondrial que tiene lugar después de la reanudación del desarrollo de *Artemia* es debido a maduración mitocondrial y no a proliferación de estas organelas.

### **Estudio de la transcripción de los genes mitocondriales de *Artemia***

(J. A. Carrodegua, J. Santiago y C. G. Vallejo)

Se han identificado los sitios de iniciación de la transcripción, elaborado el mapa de transcripción y estudiado la RNA polimerasa mitocondrial de *Artemia*. El sitio principal de inicio de la transcripción del genoma mitocondrial de *Artemia* está localizado en el extremo 5' del RNA ribosómico 12S y es heterogéneo. Existe al menos otro sitio de iniciación para la cadena pesada situado a 250 nucleótidos cadena arriba del anterior que es utilizado con menor frecuencia. La identificación de estos sitios de transcripción se ha hecho mediante el marcaje de los extremos 5' nacientes del RNA por la guanililtransferasa y otras técnicas de extensión del cebador, protección a nucleasa S1 y a RNasa. En relación con la cadena ligera, se ha identificado al menos un posible candidato a inicio de la transcripción en esa cadena.

Se ha construido el mapa de transcripción del genoma mitocondrial de *Artemia* mediante la técnica de Northern usando distintos tipos de sonda (de DNA de doble cadena, ribosondas y oligonucleótidos) derivadas de las distintas regiones del DNA mitocondrial. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que a) este genoma se transcribe en forma de unidades policistrónicas iniciadas en uno o pocos promotores en cada cadena, como en otros sistemas mitocondriales animales; b) los transcritos policistrónicos son procesados posteriormente a transcritos maduros utilizando los tRNAs como señales de procesamiento, siendo este procesamiento menos eficiente en las regiones del genoma que no tienen tRNAs; c) la cadena pesada se transcribe en su totalidad, incluida la región no codificante de la que se han

mapeado transcritos estables; d) la transcripción es terminada en ambas direcciones a nivel del tRNA de leucina.

Se ha purificado parcialmente la RNA polimerasa mitocondrial de *Artemia*. Las características de la reacción enzimática catalizada por nuestra preparación en una transcripción inespecífica son típicas de las otras RNA polimerasas mitocondriales conocidas (humanos, *Xenopus*, levadura). Sin embargo, cuando se ha tratado de transcribir in vitro moldes de DNA mitocondrial de *Artemia*, no se ha conseguido transcripción específica. Esta incapacidad puede ser debida a la pérdida del factor de especificidad durante la purificación, lo que no ocurre en los sistemas conocidos y que sugiere que el factor de *Artemia*, y probablemente de invertebrados, sea de naturaleza diferente. Esta interpretación está apoyada por la protección a DNasa I alrededor del sitio principal de inicio de la transcripción que se observa con la preparación mitocondrial cruda pero no con la purificada.

Se conoce poco de los mecanismos implicados en el procesamiento de los transcritos policistrónicos mitocondriales y nada, en particular, sobre la poliadenilación de los transcritos maduros que tiene lugar (en *Artemia*, incluso en los RNAs ribosomales) durante el procesamiento. No se ha descrito la poli A polimerasa en ningún sistema mitocondrial y, por tanto, no se sabe si es o no diferente de las localizadas en el citoplasma/núcleo. Hemos detectado una actividad poli A polimerasa en la fracción mitocondrial de *Artemia* que parece tener características diferentes de las descritas para las poli A polimerasas animales descritas. Actualmente estamos purificando el enzima con objeto de clonarla y poder estudiar los mecanismos que regulan la poliadenilación de los RNAs mitocondriales.

### **Presencia de proteína kinasas en las mitocondrias de *Artemia***

(C.G. Vallejo, en colaboración con la doctora Margarita F. Renart)

Llama la atención el desconocimiento sobre el papel que puedan tener fenómenos de fosforilación en la biogénesis mitocondrial, teniendo en cuenta que los genes que codifican en el genoma mitocondrial para proteínas tienen sitios consenso de fosforilación para distintas proteína kinasas. Hay muy poca información sobre la presencia de proteína kinasas en la mitocondria; ninguna en mitocondrias de invertebrados y muy escasa, en mamíferos. En un acercamiento inicial al problema, hemos identificado la presencia de caseína kinasa II y la proteína kinasa dependiente de cAMP en las mitocondrias de *Artemia*. La caseína kinasa II parece, por distintos criterios, ser el mismo enzima del citosol mientras que la kinasa mitocondrial dependiente de cAMP tiene una afinidad por el péptido específico Kemptide un orden de magnitud mayor que el enzima citosólico. Las dos kinasas fosforilan distintas proteínas mitocondriales en *Artemia*.

### **Tesis doctorales**

José Alberto Carrodegua Villar. "Identificación de los sitios de inicio de la transcripción y elaboración del mapa de transcripción del genoma mitocondrial de *Artemia*". Director: Carmen García Vallejo. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1994

Jorge Santiago Martín. "RNA polimerasa mitocondrial de *Artemia franciscana*. Aislamiento, caracterización y estudio de la interacción con el promotor principal del genoma mitocondrial homólogo". Director: Carmen García Vallejo. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1995

**Palabras clave**

Mitocondria, expresión génica, DNA mitocondrial, RNAs mitocondriales,  $\beta$ -ATPasa, enzimas mitocondriales, transcripción, promotores mitocondriales, RNA 12S, mapa de transcripción, RNA polimerasa, transcripción in vitro, protein kinasas mitocondriales.

## **Fisiopatología de la biogénesis mitocondrial**

Investigador principal:	Rafael Garesse Alarcón. Profesor Titular
Investigadores asociados:	Belén Bornstein Sánchez. Médico especialista en Bioquímica Clínica Roberto Marco Cuellar. Catedrático de Universidad.
Becarios predoctorales:	Ana Talamillo Cancedo Inmaculada Ruiz de Mena Cristina Ugalde Bilbao
Personal de apoyo:	Pilar Ochoa Cao

### **Biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster***

(A. Talamillo, I. Ruiz de Mena, C. Ugalde, P. Ochoa, R. Marco y R. Garesse)

La biogénesis mitocondrial es un proceso básico para las células eucarióticas que se encuentra mal caracterizado, y en el que intervienen dos genomas localizados en compartimentos física y genéticamente diferentes, el núcleo y la propia mitocondria. Uno de los mecanismos que controla el proceso es la regulación transcripcional de los genes mitocondriales codificados en el núcleo, que han de expresarse de un modo coordinado con los que se encuentran codificados en el genoma mitocondrial. En nuestro grupo estamos estudiando los mecanismos que controlan esta expresión coordinada utilizando como modelo *Drosophila melanogaster*. Hemos caracterizado una serie de genes importantes en biogénesis mitocondrial y estamos estudiando sus regiones promotoras con objeto de caracterizar las zonas reguladoras relevantes e identificar los factores de transcripción que se unen a las mismas. Actualmente estamos estudiando cuatro genes diferentes, dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la H<sup>+</sup> ATP sintetasa, la delta amino levulinato sintetasa, clave en la síntesis del grupo hemo y la  $\gamma$  polimerasa, el enzima que regula el número de copias del DNA mitocondrial. El estudio lo estamos realizando tanto en células en cultivo utilizando técnicas convencionales como "in vivo" mediante la transformación con elementos P. La posibilidad actual de disponer de un elevado número de líneas GAL4 de *Drosophila* permite sobreexpresar estos genes y versiones mutadas de los mismos en una amplia variedad de contextos celulares diferentes.

### **Caracterización molecular de citopatías mitocondriales**

( B. Bornstein, P. Ochoa y R. Garesse; en colaboración con J. Arenas, Hospital 12 de Octubre, Madrid)

La patología mitocondrial comprende un elevado número de enfermedades degenerativas que afectan fundamentalmente al músculo y al sistema nervioso, y que en su conjunto constituyen un importante apartado de la patología humana.. 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. Aunque en la actualidad se han descrito un gran número de mutaciones, en la mayoría de los casos se desconoce su patogenicidad y como correlacionan las diferentes mutaciones con los fenotipos que originan. Nuestro grupo está

colaborando con el del Dr. Joaquín Arenas (Hospital 12 de Octubre, Madrid) en la identificación de nuevas mutaciones y en la caracterización molecular de las mismas. En una familia con Epilepsia Mioclónica y Fibras Rojo Rasgadas (MERRF) hemos identificado la presencia de dos nuevas mutaciones en el tRNA<sup>LYS</sup>. En la actualidad estamos comenzando su estudio en células  $\rho^0$  con objeto de caracterizar la patogenicidad de las mutaciones individuales y de la doble mutación, ya que todas las versiones del tRNA se encuentran presentes en el músculo del paciente. Por otro lado hemos realizado un estudio en cardiomiopatías de etiología desconocida con objeto de identificar posibles alteraciones de la función mitocondrial. En las cardiomiopatías dilatadas existe un importante aumento de la actividad de los complejos I y III en ausencia de un aumento en la cantidad de mitocondrias o transcripción mitocondrial, que no se produce en las cardiomiopatías isquémicas.

## Publicaciones

R. Marco, E. de Juan, I. Ushakov, A. Hernandorena, J. Gonzalez-Jurado, M. Calleja, M. Manzanares, M. Maroto, R. Garesse, G. Reitz and J. Miquel (1994) Arthropod model systems for studying complex biological processes in the space environment. *Adv. Space Res.* 14: 215-227.

R.Garesse (1994) "Presente y futuro de las técnicas de secuenciación de DNA. En "Nuevas Tendencias: Avances en Ingeniería Genética" (M.Vicente Ed.) CSIC, Madrid, pp 61-72.

M.L.Perez, J.R.Valverde, B.Batuecas, F.Amat, R.Marco and R.Garesse. (1994) Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic populations. *J.Mol.Evol.* 38: 156-168.

J.R.Valverde, R.Marco and R.Garesse (1994) A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5368-5371.

J.R.Valverde, B.Batuecas, M.C.Moratilla, R.Marco and R.Garesse (1994) "The complete sequence of *Artemia* mitochondrial DNA" *J. Mol. Evol.* 39: 400-408.

E. Vega-Núñez, A. Menendez-Hurtado, R. Garesse, A. Santos and A. Perez-Castillo (1995). Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning. *J. Clin. Invest.* 96: 893-899.

P. Peña, C. Ugalde, M. Calleja and R. Garesse (1995) Analysis of the mitochondrial ATP synthase  $\beta$  subunit gene in *Drosophilidae*: structure, transcriptional regulatory features and developmental pattern of expression in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 312: 887-897.

### **Tesis doctoral**

Pilar Peña Peña. Caracterización del gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la H<sup>+</sup> ATPasa de *Drosophila melanogaster*. Estudio de su expresión durante embriogénesis y envejecimiento. Director: Rafael Garesse. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 1995

### **Palabras clave**

mitocondria, *Drosophila melanogaster*, promotores mitocondriales, DNA mitocondrial, ATP sintetasa, patología mitocondrial, MERRF.

## **Factores Genéticos y Epigenéticos en el desarrollo y envejecimiento de artrópodos.**

Investigador principal:	Roberto Marco, Catedrático de Universidad
Investigadores asociados:	Rafael Garesse, Profesor Titular U.A.M. Margarita Cervera, Profesora Titular U.A.M. Alberto Domingo, Profesor Titular, Universidad de Alcalá. Javier Medina, Colaborador Científico, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Emilia Cantón, Investigador del Servicio de Microbiología, Hospital la Fe de Valencia. Miguel Gobernado, Jefe de Servicio de Microbiología, Hospital la Fe de Valencia. Emilio de Juan, Profesor Ayudante, Departamento de Histología, Facultad de Medicina de Alicante. Jaime Miquel, Profesor Asociado, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina de Alicante. Fr. Amat, Instituto de Acuicultura del CSIC, Torre de la Sal, Castellón.
Investigadores visitantes:	M.Luz Pérez, Profesor Titular de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. Arantxa Hernandorena, Laboratoire du Museum National d'Histoire Naturelle, Biarritz, Francia. Terri Williams, Department of Biology, Alabama.. Mauricio González, ICC, Universidad de Chile.
Becario Post-doctoral:	Alberto Benguría, Doctor en Ciencias.
Becarios Pre-Doctorales:	José Antonio Mas Amparo Pastor Ana Salgado
Personal, de apoyo :	Aida Villa, Ayudante de Investigación. Marta San Román, Técnico de Laboratorio Contratada por el Plan Nacional del Espacio Sofía Cabrero Martín, Técnico en formación de la CAM

## **Purificación y Propiedades de Proteínas Musculares en *Drosophila* y otros artrópodos.**

(R. Marco, Aida Villa, Ana Salgado, J. A. Mas, M. San-Román, M. González, A. Domingo y M. Cervera)

Dentro de un proyecto de Red financiada por la ECC, centrado en la caracterización bioquímica, genética y molecular del filamento delgado del músculo de invertebrados hemos seguido con la caracterización de alguno de sus componentes de propiedades potencialmente reguladoras, en particular de las isoformas de Troponina T y H, esta última una isoforma de alto peso molecular de la tropomiosina específica de músculo de vuelo de insectos. Estas proteínas presentan características en parte análogas pero también diferenciales de sus

correspondientes en vertebrados. Durante este bienio nos hemos concentrado en abordar los problemas de la purificación de las principales proteínas estructurales de los músculos de invertebrados. Hemos desarrollado métodos selectivos de solubilización de los distintos componentes del complejo Tropomiosina-Troponina de músculo de *Drosophila* y de músculo de cola de cangrejo. Los extremos C terminales de las secuencias de troponina T presentan colas de poliaminoácidos cuya función es desconocida, pero que estén relacionados con sus propiedades de unión de  $Ca^{++}$ . Se han producido distintas construcciones que expresan en *E. coli* la proteína completa, el extremo N terminal sin la cola de poliglutámico y la cola de poliglutámico con los que estamos reexaminando las propiedades de unión

### **Modificación en los procesos de desarrollo y envejecimiento de *Drosophila melanogaster* y *Artemia* producido por alteraciones en las fuerzas gravitatorias y en otras condiciones ambientales.**

(R. Marco, A. Benguría, A. Hernandorena, E. de Juan, M. San-Román, J. Miquel, y R. Garesse)

El desarrollo y el envejecimiento son dos procesos biológicos extraordinariamente interesantes para su estudio en condiciones de microgravedad, tanto para estudiar sus posibles alteraciones en este ambiente inusual, como para establecer un papel hoy en día desconocido del vector gravedad en estos procesos que en condiciones normales sobre la superficie terrestre siempre están expuestos a la presencia constante de este parámetro físico. En los experimentos *IML-2* que voló en el Shuttle Columbia en Julio de 1994 y en el satélite ruso Fotón-10 realizado a principios de 1995 se confirmó y extendió la información que teníamos sobre el comportamiento de estos procesos biológicos en el espacio. De acuerdo con experimentos anteriores, se encontró un desarrollo embrionario de las cepas salvajes de *Drosophila* esencialmente normal con pequeñas modificaciones cuantitativas que no pueden atribuirse a la microgravedad. Sin embargo, en relación con la aceleración del envejecimiento detectado en experimentos anteriores, se ha podido detectar un enorme incremento en la motilidad de los adultos de *Drosophila* en microgravedad usando bien registros en video o un sistema de monitorización desarrollado por nuestro grupo. También se han volado muestras del crustáceo *Artemia* que dada su adaptación poco corriente con un estado durmiente al principio de su desarrollo, puede utilizarse además de forma efectiva en experimentos de Exobiología y/o de Radiación Espacial en la instalación Biopan (Fotón 9), en el vuelo del *IML-2* (en la configuración Biostack, desarrollada por el grupo alemán del Dr. Reitz en el DLR de Colonia) y en la instalación IBIS desarrollada por el CNES (Fotón 10), la Agencia Nacional Francesa. Se han extendido el análisis del fenómeno del envejecimiento, de la actividad mitocondrial a distintas condiciones ambientales controladas en el laboratorio, tales como el uso de distintas temperaturas, cepas seleccionadas de distinta longevidad y distintas condiciones nutricionales.

### **Aplicaciones de las Microondas a la Tecnología Biológica.**

(R. Marco, J. A. Mas, S. Cabrero, F. J. Medina, A. Pastor, E. Cantón y M. Gobernado)

Varios problemas tecnológicos presentan características muy particulares cuando hay que realizarlos en las condiciones confinadas e inaccesibles de las instalaciones espaciales, en particular, la fijación y preservación de las muestras biológicas, la esterilización del material y la eliminación de los residuos. Por otra parte cualquier avance en este terreno, puede ser objeto de transferencia tecnológica. Durante el pasado bienio, se ha continuado con este estudio iniciando la profundización en las causas subyacentes a las aceleraciones encontradas

con anterioridad. Se ha preparado instrumentación con la que explorar el efecto de las microondas de forma independiente a la temperatura, fijando los niveles de potencia necesaria para los efectos. Se han puesto a punto reacciones bioquímicas modelo para poder estudiar los efectos en una situación más simple. Con esta instrumentación y metodología estamos dispuestos a abordar en el futuro próximo la optimización de estos tratamientos y posiblemente la propuesta de una nueva instrumentación mejor concebida para estas aplicaciones que los magnetrones convencionales.

**Estudios filogenéticos en *Artemia*, utilizando el DNA mitocondrial como marcador molecular. Utilización de marcadores moleculares en *Artemia* para analizar los efectos de la manipulación nutricional en el desarrollo postembrionario.**

(M. L. Perez, T. Williams, A. Hernandorena, Fr. Amat, R. Garesse y R. Marco)

Continuando con el estudio de la sistemática del género *Artemia* y las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas de este crustáceo usando su DNA mitocondrial, hemos seguido clonando y secuenciado varias regiones específicas del genoma mitocondrial de poblaciones diferentes, americanas y euroasiáticas. Hemos completado la identificación de las cepas partenogenéticas. Concretamente, las cepas partenogenéticas tetraploides, que se distribuyen entremezcladas con las cepas partenogenéticas diploides en Eurasia comparten el DNA mitocondrial con las cepas bisexuales de China. Se ha continuado con el estudio de las propiedades del gen *engrailed* en *Artemia*, utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos contra la proteína *engrailed* de *Artemia* que con otros marcadores moleculares pueden aclarar próximamente las bases genéticas de las modificaciones en los patrones de desarrollo obtenidos mediante distintos tratamientos nutricionales.

**Publicaciones.**

Perez, M. L., Valverde, J.R., Batuecas, B., Amat, F., Marco, R. y R. Garesse (1994) Speciation in the *Artemia* genus: Mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps, *J. Mol. Evol.*, 38, 156-168.

Marco, R., de Juan, E., Ushakov, I., González-Jurado, J., Hernandorena, A., Calleja, M., Maroto, M., Manzanares, M., Garesse, R., Cervera, M., Miquel, J. y Alpatov, A. (1994) Arthropod model systems for studying how development and aging is affected in the Space environment. *Adv. Space Res.* 14(8) 215- (8) 227.

Marco, R., Ushakov, I., de Juan, E., Domingo, A., Manzanares, M. y Hernandorena, A., Miquel, J. (1994) Recent Approaches in the Analysis of Weightlessness Effects on Arthropod Development. *J. Gravit. Physiol.* 1, 112-113.

Valverde, J. R., Marco, R. y R. Garesse (1994) A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 91, 5368-5371.

Medina, F. J., Cerdido, A., Maroto, M., Manzanares, M. y R. Marco (1994) Enhancement of the Immunochemical detection of antigens by microwave irradiation. Benefits and limitations studied in isolated plant nuclei and *Drosophila* embryos in toto, *Histochemistry*, 102, 45-50.

Valverde, J. R., Batuecas, B., Moratilla, C., Marco, R. y R. Garesse. (1994) The complete

mitochondrial sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *J. Mol. Evol.*, 39, 400- 408.

Marco, R., Medina, J., de Juan, E., Ushakov, I., Manzanares, M. y Maroto, M. (1994) Technological Advances in the Analysis of the Effects of Space Microgravity on Arthropod Development: Microwave Applications in Fixation and Histoprocessing Techniques in space biology" Proc. 5th Symposium Life Science Research in Space, Arcachon, ESA SP-366, p 153-158.

Maroto, M., Arredondo, J., San Román, M., Marco, R. y M. Cervera (1995) Analysis of the Paramyosin/Miniparamyosin Gene: Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct Paramyosin Isoform, widely distributed in invertebrates. *J. Biol. Chem.* 270, 4375-4382.

Medina, F. J., Cerdido, A. y R. Marco (1995) Microwave Irradiation Improvements of Silver Staining of the Nucleolar Organizer (Ag-NOR) Technique. *Histochemistry*, 103, 403-413.

Marco, R., González-Jurado, J., Calleja, M., Manzanares, M., Maroto, M., de Juan, E. y J. Miquel (1995) Effects of Microgravity on *Drosophila melanogaster* Development and Aging. Biorack on Spacelab IML-1, ed by C. Mattok, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, p 199-203.

Marco, R. (1995) La Investigación Biológica Espacial en España: Un ejemplo muy especial de la delicada situación que atraviesa la investigación en nuestro país. *Medicina Espacial y Ambiental*, 1. (4) 201- 206.

## **Regulación hormonal de la expresión génica durante el desarrollo.**

Investigadora principal:	Ana Perez Castillo, Titulada Superior Especializada
Investigador asociado:	Angel Santos Montes, Profesor Titular, Dpto.Bioquímica y Biología Molecular, Fac.Medicina, UCM)
Becario postdoctoral:	Benilde Jimenez Cuenca
Becarios predoctorales:	Carlos Pipaón Gonzalez. Elena Vega Nuñez Manuela Rodriguez García Ana Menéndez Hurtado
Colaboraciones:	Antonio Zorzano (Catedrático Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona)

### **Efecto del hipotiroidismo congénito sobre la expresión génica en cerebro de rata.**

(A. Perez Castillo, A. Santos, E. Vega, A. Menéndez)

La hormona tiroidea (T3, 3,5,3'-L-triiodotironina) es un importante regulador del desarrollo, crecimiento y metabolismo de vertebrados. La mayoría de estos efectos están mediados por receptores nucleares específicos que pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción regulando la expresión génica en respuesta a la unión de sus respectivos ligandos. Uno de los efectos más importantes de la hormona tiroidea es su control del desarrollo del cerebro. En humanos la deficiencia de T3 está asociada con un retraso mental grave e importantes defectos neurológicos que incluyen sordera y falta de coordinación motora. En la rata, el hipotiroidismo experimental resulta en un desarrollo cerebral defectuoso con una conectividad interneuronal disminuida, una menor mielinización y alteraciones en la migración celular y en los niveles de neurotransmisores. Sin embargo, sólo hace pocos años se han empezado a conocer genes diana específicos responsables de la acción de la T3 en este tejido. Se sabe que esta hormona juega un papel muy importante en la función mitocondrial de tejidos como hígado, riñón y músculo esquelético. Sin embargo las mitocondrias de cerebro se han considerado tradicionalmente que no responden al estado tiroideo. Nosotros, utilizando técnicas de hibridación substractiva, hemos aislado varios cDNAs cuyos niveles varían con el estado tiroideo. Análisis de su secuencia han mostrado que tres de ellos correspondían a genes mitocondriales: la subunidad III de la citocromo c oxidasa y los rRNAs 12S y 16S. Los niveles de estos tres RNAs en estado estacionario son menores en animales hipotiroideos, comparados con controles, durante todo el período postnatal. El contenido de al menos uno de estos RNAs: el rRNA 16S es también inferior en animales hipotiroideos durante la vida fetal. Este hecho sugiere, en contra de lo que se pensaba hasta ahora, que la T3 puede tener un efecto prenatal en el cerebro en desarrollo. A la vista de estos resultados decidimos averiguar si la T3 tenía también efecto sobre otros genes mitocondriales. Para ello estudiamos los niveles de transcritos codificados en la mitocondria: la subunidad I de la citocromo c oxidasa, apocitocromo b y la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa. Nos encontramos con que los niveles de todos ellos eran menores en neonatos hipotiroideos, lo cual sugiere que la T3 regula la concentración de todos los transcritos mitocondriales. De hecho cuando examinamos el contenido de DNA mitocondrial

tanto en cerebros hipotiroideos como controles, no observamos ninguna diferencia entre ellos, lo cual indica que, muy probablemente, la expresión génica mitocondrial es regulada por T3 a nivel transcripcional y/o estabilización de los RNAs. Los mensajeros transcritos en el núcleo que codifican para proteínas mitocondriales están también disminuidos en el cerebro de neonatos hipotiroideos. Estos cambios en la expresión génica inducidos por el hipotiroidismo en las mitocondrias del cerebro en desarrollo se encuentran también acompañados por una significativa bajada (40%) en la actividad de la citocromo c oxidasa. Todos estos resultados muestran que la hormona tiroidea es un regulador importante de la función mitocondrial en el cerebro en desarrollo, probablemente por medio de sus receptores nucleares, y proporcionan también bases moleculares específicas que explican el efecto que tiene la T3 sobre el desarrollo del cerebro. En la actualidad estamos estudiando si estos efectos observados sobre la expresión génica mitocondrial se traducen en alteraciones en la morfología y/o funcionalidad de estas mitocondrias. Estamos intentando también averiguar el mecanismo por el cual la T3 regula la expresión génica mitocondrial.

### **Regulación del promotor del gen NGFI-A por hormona tiroidea y ácido retinoico.**

(A. Perez Castillo, A. Santos, C. Pipaón)

En estudios previos utilizando como modelo experimental ratas hipotiroideas en desarrollo hemos observado una regulación de la expresión del gen temprano NGFI-A por T3 durante el desarrollo del cerebro. Ya que estudios de "run on" mostraban una regulación directa de la transcripción de este gen por T3, decidimos investigar el modo de transactivación del promotor de este gen por esta hormona. Para ello clonamos un fragmento correspondiente a los nucleótidos -1368/+43 de dicho promotor en un plásmido testigo conteniendo el gen de la luciferasa y realizamos experimentos de transfección de células de neuroblastoma (N2A). Lo primero que observamos es que tanto la T3 como el ácido retinoico inducen rápidamente la expresión endógena de este gen y que su cinética es bifásica. Los estudios de transfección con la construcción antes citada no mostraron ninguna regulación por T3 o retinoico. Sin embargo, cuando las células son cotransfectadas con plásmidos de expresión para receptores de T3 (isoformas a1 y b1) se produce un aumento moderado (2,5 veces) en la actividad luciferasa. Sin embargo, esta transactivación es independiente de T3. Delecciones 5' de este promotor hasta el nt -927 anulan la respuesta del gen testigo a ambos tipos de receptores, lo que indica que los elementos que median la respuesta (independiente de T3) del promotor a los receptores de T3 se encuentran en la zona -1368/-927. La falta de regulación por T3 se puede atribuir a varias causas. Una de ellas sería que los verdaderos elementos de respuesta se encontraran más 5' de la zona estudiada. Sin embargo, ya que en la zona estudiada se encuentran posibles elementos de respuesta teóricos, la explicación podría residir en la presencia de elementos silenciadores en alguna zona del promotor. De hecho por análisis de secuencia hemos observado dos zonas que contienen potenciales secuencias "atenuadoras" semejantes a las descritas en otros genes regulados por T3. En la actualidad estamos haciendo más delecciones de este trozo de promotor para eliminar estas posibles secuencias silenciadoras y averiguar si esta es la causa de la falta de respuesta a T3. Estamos empezando también a realizar experimentos de retardo en gel con oligos construidos a partir de las posibles zonas de respuesta a T3 presentes en el promotor.

## **Expresión de los receptores para T3 y actividad desyodasa en la hipófisis en desarrollo y su regulación por T3.**

(A.Perez Castillo, A. Santos, M.Rodriguez)

En trabajos anteriores hemos observado una regulación de los genes hipofisarios hormona del crecimiento (GH) y tirotropina (TSH) por T3 desde muy temprano en el desarrollo de la hipófisis. Ya que la acción de la hormona tiroidea depende en último extremo de la presencia de receptores y de los propios niveles intracelulares de T3, lo siguiente que estudiamos fueron los niveles de varias isoformas de receptor de T3 presentes en la hipófisis (TRa1, TRa2, TRb1 y TRb2) y su control por esta hormona, así como las enzimas responsables de los niveles plasmáticos e intracelulares de T3: desyodasas tipo I (5'DI) y tipo II (5'D2). Ambos genes, a y b, se expresan en la hipófisis fetal, sin embargo su modelo de desarrollo y su regulación por T3 son diferentes. Los niveles de a1 y a2 aumentan de manera coordinada durante el período postnatal hasta alcanzar un pico el día 5, después del cual la concentración de ambos disminuye hasta los niveles del animal adulto. La expresión del gen TRa está reprimida por T3, de manera que las concentraciones de ambos, a1 y a2, son menores en las hipófisis de animales controles comparados con hipotiroideos. La magnitud de la respuesta es particularmente alta antes del nacimiento. La acumulación de transcritos TRb2 es muy similar a la descrita para los mensajeros a, aunque está presente en mayor cantidad. Sin embargo, la concentración de mensajeros para TRb1 es extremadamente baja en fetos y van aumentando durante el período postnatal hasta alcanzar un pico el día 30, que corresponde ya a los niveles del adulto. En cuanto a su regulación por T3, ambas isoformas se regulan de manera diferente: los animales hipotiroideos presentan valores más bajos de TRb1, mientras que los niveles de TRb2 aumentan de 2-3 veces en estos animales, durante todo el período de desarrollo estudiado. En cuanto a las desyodasas, ambas actividades tienen diferentes modelos de desarrollo: 5'DII es la actividad fundamental encontrada en hipófisis fetales, con niveles similares a los del adulto, por el contrario, los niveles de 5'DI son muy bajos antes del nacimiento y van incrementando progresivamente con la edad del animal. En el desarrollo de la hipófisis de animales hipotiroideos los niveles de actividad de 5'DI son sensiblemente inferiores a los que presentan animales controles, mientras que se encuentra aumentada la actividad 5'DII. Estos datos, junto con los anteriores de la regulación por T3 de los genes GH y TSH desde etapas muy tempranas del desarrollo, sugieren que la hormona tiroidea puede jugar un papel importante en el desarrollo fetal y neonatal de la hipófisis.

### **Publicaciones.**

A.Castelló, J.C.Rodriguez-Manzaneque, M. Camps, A.Perez-Castillo, X.Testar, M.Palacín, A.Santos y A.Zorzano. (1994) Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of glut4 and glut1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of glut4 expression by thyroid hormone. *J.Biol.Chem.*269, 5905-5912.

B.Mellström, C.Pipaón, JR Naranjo, A.Perez-Castillo y A.Santos. (1994) Differential response to thyroid hormone of the immediate-early gene NGFI-A in the developing nervous system of the rat. *Endocrinology.* 135, 583-588.

I.García, C.Pipaón, S.Alemany y A.Perez-Castillo. (1994) "Induction of NGFI-B gene expression during T-cell activation. Role of protein phosphatases" *J.Immunol.* 153, 3417-3425.

A.Perez-Castillo, Ana M. Perez-Castillo & Juan A. Saez-Nieto (1994) "Sequence of the penicillin-binding protein 2-encoding gene (*penA*) of *Neisseria perflava/sicca*". *Gene*. 146, 91-93.

M. Rodriguez-García, T.Jolín, A.Santos & A.Perez-Castillo. (1995) "Effect of perinatal hypothyroidism on the developmental regulation of pituitary growth hormone and thyrotropin genes". *Endocrinology*. 136:4339-4350.

E.Vega-Nuñez, A.Menendez-Hurtado, R.Garese, A.Santos and A.Perez-Castillo. (1995) "Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning". *J.Clin.Invest*. 96: 893-899.

### **Tesis doctorales**

Manuela Rodriguez García."Regulación durante el desarrollo de la expresión de los genes que codifican para las hormonas hipofisarias: hormona del crecimiento (GH) y hormona tirotrópica ( $\alpha$  y  $\beta$ -TSH). Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Julio, 1994.

Carlos Pipaón Gonzalez "Regulación por hormona tiroidea de la expresión del gen NGFI-A en encéfalo durante el desarrollo. Papel de NGFI-A en la diferenciación neuronal". Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Julio 1995.

### **Palabras clave**

Cerebro, desarrollo, hormona tiroidea, regulación expresión génica, mitocondria, genes tempranos, receptores de T3, actividad 5'desyodasa.

## **Aproximaciones genéticas al estudio de las vías de señalización en células de mamíferos en cultivo**

Investigador Principal:	Jaime Renart, Investigador Científico
Investigadores Asociados:	M.Margarita Behrens, Profesora Asociada UAM Margarita Díaz-Guerra, Profesora Asociada UAM
Becarios Predoctorales:	Mónica García-Gallo M. Dolores López
Personal de Apoyo:	Carmen Moratilla

### **Obtención de líneas celulares resistentes al neurotransmisor glutamato**

(M. García-Gallo, M.M. Behrens, M. Diaz-Guerra, M. Moratilla y J. Renart)

El glutamato es el agente causal de la excitotoxicidad neuronal, mediada fundamentalmente por su interacción con el receptor tipo NMDA. Para estudiar este fenómeno se están obteniendo líneas celulares derivadas del neuroblastoma N2A y de la línea HEK 293 (de riñón embrionario humano) que expresen las subunidades NR1 y NR2A y NR2C de dicho receptor, además de distintas subunidades del receptor tipo AMPA/kainato. Se utilizan sistemas de expresión regulada basada en el sistema del represor de la tetraciclina.

### **Caracterización de una línea celular derivada del neuroblastoma N2A que expresa establemente la subunidad NR1 del receptor de glutamato tipo NMDA**

(C. Moratilla, J. Renart)

Se ha construido una línea que expresa la subunidad NR1 del receptor de glutamato bajo el control del promotor de la enolasa específica de neuronas, cuyas propiedades más notables son el extender procesos en presencia de suero y el tener elevada la expresión del gen inmediatamente temprano NGFI-A. Se estudian los posibles mecanismos de este fenotipo.

### **Inducción de apoptosis por inhibición de la proteína kinasa C en células del neuroblastoma N2A de ratón**

(M.D. López, M.M. Behrens, M. Díaz-Guerra, C. Moratilla, J. Renart)

Cuando células del neuroblastoma N2A se tratan con inhibidores específicos de proteína kinasa C (Bisindolilmaleimida GF103209X y Gö 6976) se induce un proceso de apoptosis. En caso de que las células se traten con los inhibidores en ausencia de suero (condiciones que inducen un programa de diferenciación morfológica con extensión de neuritas), el proceso de diferenciación se acelera. La sobreexpresión del gen *Bcl2* protege a las células de la apoptosis, lo mismo que el tratamiento simultáneo con inhibidores de la calpaína I, (proteasa celular dependiente de calcio). Se está caracterizando este sistema, en lo que se refiere al tiempo necesario de incubación con inhibidores para que el proceso sea irreversible, papel del producto del gen *Bax* e expresión de distintos genes durante el proceso.

## **Publicaciones**

Franco, E., Behrens, M.M., Díaz-Guerra, M. and Renart, J. (1994) Structure and expression of a polyubiquitin gene from the crustacean *Artemia*. *Gene Expression* 4: 19-28.

Behrens, M.M., Martínez, J.L., Moratilla, M. and Renart, J. (1995) Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell Growth Differ.* 6: 1375-1380.

## **Palabras clave**

excitotoxicidad, apoptosis, receptores de glutamato, proteína kinasa C, Bcl2, neuroblastoma.

## **Regulación de la expresión génica durante la criptobiosis y el desarrollo**

Investigador principal: Leandro Sastre Garzón, Colaborador Científico

Becarios predoctorales: Ricardo Escalante Hernandez (hasta Enero de 1995)  
Alberto García Sáez (hasta Abril de 1995)  
Maria Asunción Ortega Sedano (hasta Enero de 1995)  
Marie-Carmen Casero Martín (desde Enero de 1995)  
Ana Martínez Lamparero (desde Octubre de 1994)

Nuestro proyecto se centra en el estudio de los mecanismos que regulan la transcripción génica en el proceso de activación del embrión enquistado del crustáceo *Artemia franciscana* y su posterior desarrollo. En los últimos años hemos aislado clones, genómicos y de cDNA, que codifican para varios genes cuya expresión se regula durante este proceso y que se describen en las líneas de trabajo. Los promotores de estos genes han sido aislados y secuenciados, determinándose los orígenes de transcripción. Hemos comenzado el estudio funcionales de estos promotores mediante experimentos de transfección en células en cultivo para delimitar las principales regiones reguladoras. Con el mismo objetivo, hemos iniciado también estudios de interacción in vitro de estos promotores con extractos nucleares que permitan definir regiones de unión a factores proteicos. Una vez caracterizados funcionalmente los promotores comenzaremos el estudio de los mecanismos reguladores que hacen que los promotores no sean funcionales en los embriones enquistados y se activen en etapas posteriores del desarrollo. Dentro de este esquema general, estamos desarrollando las siguientes líneas de trabajo:

### **Regulación de la expresión del gen de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *Artemia*.**

(Ricardo Escalante, Ana Martínez Lamparero y Leandro Sastre)

El gen de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico (SERCA) tiene un tamaño de unas 65 kb y está dividido en 18 exones, siendo la posición del 70% de los intrones idéntica en *Artemia* y vertebrados. Su transcripción origina dos mRNAs que difieren en su tamaño (5.2 y 4.5 kb) cuya expresión es específica de tejido. El mRNA de 4.5 kb se expresa en tejido muscular mientras que el mRNA de 5.2 kb se expresa en tejidos no musculares. Estos dos mRNAs se transcriben a partir de dos promotores diferentes cuya secuencia de nucleótidos y región de inicio de la transcripción se ha determinado. En la actualidad estamos estudiando los promotores de este gen, tratando de conocer los mecanismos que regulan la expresión de los dos mRNAs durante el desarrollo así como aquellos elementos que puedan estar implicados en determinar la especificidad tisular de expresión de los dos promotores.

### **Regulación de la expresión del gen que codifica para la subunidad $\alpha 1$ de la ATPasa de Na/K de *Artemia***

(Alberto García Sáez y Leandro Sastre).

Se han identificado dos genes diferentes que codifican para dos subunidades  $\alpha$  de la ATPasa de Na/K en *Artemia*. Uno de ellos, el de la subunidad  $\alpha 1$ , fue aislado en nuestro laboratorio y

se expresa en los principales órganos osmoreguladores, la glándula de la sal y la glándula de la antena por lo que parece jugar un papel importante en la osmoregulación del organismo. Este gen está dividido en 15 exones y ocupa alrededor de 40-45 kb del DNA. Una característica diferencial de este gen es la existencia de múltiples alelos que pueden variar entre si hasta en un 4% de los nucleótidos de las regiones codificantes. Esta variabilidad podría estar relacionada con la capacidad de adaptación a distintos medios salinos, hipótesis que estamos tratando de comprobar. Se ha caracterizado la región promotora del gen y determinado el origen de transcripción y la secuencia de nucleótidos del promotor. En la actualidad estamos caracterizando funcionalmente el promotor para estudiar los mecanismos de regulación de la expresión del gen.

### **Regulación de la expresión de tres genes de actina de *Artemia***

(Maria Asunción Ortega, Marie Carmen Casero y Leandro Sastre)

Estudios previos nos habían permitido caracterizar los clones de cDNA que codifican para tres isoformas de actina en *Artemia*, una de ellas se expresa en músculos y las otras dos en tejidos no musculares. El número de intrones presentes en estos genes varía entre tres y seis. Uno de los intrones, común para dos de las actinas de *Artemia*, no había sido descrito previamente en ningún otro organismo. Se ha secuenciado la región promotora de los tres genes de actinas y se están caracterizando en la actualidad. El estudio comparativo de estos promotores, junto con los de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico, esperamos que nos permitan definir alguno de los elementos reguladores que activan el programa de expresión génica específico de tejido muscular en *Artemia*.

### **Estructura y expresión del gen de la proteína que se une a la caja TATA (TBP) de *Artemia*.**

(Leandro Sastre)

Uno de los mecanismos generales que regulan la transcripción durante el desarrollo de *Artemia*, podría ser la modulación de los niveles de expresión y/o actividad de factores básicos de la maquinaria de síntesis de RNA. Para comprobar esta posibilidad hemos comenzado el estudio del factor de transcripción TBP (Proteína que se une a la caja TATA) porque es un factor básico de transcripción que parece estar implicado en la regulación de la transcripción de la tres RNA polimerasas. Se han aislado clones de cDNA y genómicos que comprenden la totalidad de la región codificante de este gen, pudiendo observar que el gen está dividido en 7 exones. La determinación de los niveles de mRNA y proteína durante el desarrollo de *Artemia* ha mostrado que no varían apreciablemente durante este periodo. En particular, el embrión enquistado posee niveles de mRNA y proteína similares a los de embriones en desarrollo lo cual descarta la hipótesis de que la ausencia de este factor sea determinante de la inactividad transcripcional del quiste aunque el factor podría ser inactivo en este estadio.

## **Publicaciones**

Escalante, R. y Sastre, L. Structure of *Artemia franciscana* sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. *J. Biol. Chem.*, 269, 13005-13012. 1994.

Escalante, R., García-Sáez, A., Ortega, M-A. y Sastre, L. Gene expression after resumption of development of *Artemia franciscana* cryptobiotic embryos. *Biochem. Cell Biol.*, 72, 78-83. 1994.

Escalante, R. y Sastre, L. Identification of an *Artemia franciscana* retropseudogene containing part of the last exons of the sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase-encoding gene. *Gene*, 149, 377-378. 1994.

Escalante, R., García-Sáez, A. y Sastre, L. In situ hybridization analyses of Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunits expression during early larval development of *Artemia franciscana*. *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 391-399. 1995.

Escalante, R. y Sastre, L. Tissue-specific alternative promoters regulate the expression of the two sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase isoforms from *Artemia franciscana*. *DNA and Cell Biology*, 14, 893-900. 1995.

## **Tesis doctorales**

Maria Asunción Ortega. "Estructura y expresión de los genes de tres isoformas de actina en *Artemia*. Caracterización de las regiones reguladoras de su expresión". Director: Leandro Sastre. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 1994.

Ricardo Escalante Hernandez. "Estructura y expresión del gen de la ATPasa de calcio de retículo sarcoplásmico de *Artemia franciscana*". Director: Leandro Sastre. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 1994.

Alberto García Sáez, "Estudio de la estructura, expresión y polimorfismo del gen de una isoforma de la subunidad  $\alpha$  de la ATPasa de Na/K de *Artemia franciscana*. Director: Leandro Sastre. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 1995.

## **Palabras clave**

Expresión génica, transcripción, *Artemia*, crustáceos, desarrollo, criptobiosis, actina, ATPasa, calcio, sodio.

**Departamento de Regulación Hormonal.**

## **Regulación de la expresión génica por la subfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas/ácido retinoico/vitamina D3 en células hipofisarias y neuronales.**

Investigadora Principal	Ana Aranda , Profesora de Investigación
Becarios Postdoctorales:	Pilar Peña (Febrero-Diciembre 1994) Jose Miguel Cosgaya (desde Febrero 1995) Rosa Tolón (desde Septiembre 1995)
Becarios Predoctorales:	Jose Miguel Cosgaya (hasta Febrero 1995) Ana M Jiménez-Lara. Teresa Palomino. Ana Isabel Castillo. Germán Perez Juste (desde Enero 1995).
Personal de Apoyo:	Aida Villa (hasta Diciembre 1994) Carmen Luengo (desde Diciembre 1994)

## **Interacción entre diferentes miembros de la superfamilia de receptores nucleares en la regulación de la expresión de genes hipofisarios.**

(A.I. Castillo, A.M. Jimenez-Lara, T. Palomino, P. Peña, A. Aranda).

El gen de la hormona de crecimiento de rata (GH) contiene un HRE (elemento de respuesta hormonal) a través del cual los receptores nucleares de vitamina D3, ácido retinoico (RA) y hormonas tiroideas (T3) regulan su expresión. El efecto de estas hormonas en las células intactas aumenta significativamente cuando las histonas están hiperacetiladas, demostrando que los cambios en la estructura de la cromatina que alteran la disponibilidad de los sitios de unión para los receptores y otros factores de transcripción regulan la activación transcripcional de los receptores nucleares. Se está analizando la interacción entre los diferentes receptores en otros HREs de otros genes. Dependiendo del tipo de elemento y de los homo y heterodímeros formados, los receptores pueden o bien cooperar o bien competir transcripcionalmente. Sobre el del gen de RAR $\beta$ 2 (que se autoregula positivamente por el RA), la VD ejerce una fuerte inhibición en la que podría participar la competición por proteínas coactivadoras (ya que esta inhibición desaparece tras la sobreexpresión de E1A que activa este promotor) o la interacción con componentes de la maquinaria transcripcional básica y mas concretamente de las proteínas de unión a la caja TATA. También estamos estudiando el efecto de estos receptores y del receptor "huérfano" PPAR sobre la expresión del gen de la prolactina. Los diferentes ligandos parecen regular la expresión de este gen a través de secuencias comprendidas en las 3 kb de su zona 5'. En experimentos posteriores se mapearán los elementos responsables de esta regulación. La expresión tanto del gen de prolactina como de la GH requiere la unión del factor de transcripción hipofisario GHF-1/Pit-1a sus promotores. Los receptores nucleares actúan sinérgicamente con este factor en la regulación de la expresión de ambos genes. Actualmente estamos estudiando el efecto de diferentes mutaciones de los receptores que afectan la unión del ligando, la dimerización o la unión a coactivadores sobre este sinergismo. Existe una forma del factor (GHF-2) producida por procesamiento alternativo. La afinidad de esta forma por su elemento de reconocimiento en el DNA es muy inferior a la del GHF-1 y su capacidad de transactivación es también muy

inferior. La formación de heterodímeros no funcionales entre ambos factores y/o el secuestro de otros factores nucleares podrían contribuir a sus efectos diferenciales. La interacción entre los receptores nucleares y el GHF-1 es aun más compleja ya que tanto la T3 como el RA regulan de forma diferencial su expresión. Estos efectos no son debidos a la unión a un HRE clásico sino que se ejercen a través de otros elementos del promotor y concretamente a un elemento de regulación positiva que une GHF-1 y dos elementos de respuesta al AMP cíclico (CREs). Ambos CREs son necesarios para el efecto de los receptores sobre el promotor de GHF-1.

### **Interacción de los receptores nucleares con las neurotrofinas y el oncogén *ras* sobre la proliferación y diferenciación de células de origen neuronal.**

(J.M.Cosgaya, G. Pérez Yuste y A. Aranda).

La adición de RA a las células PC12 produce un profundo bloqueo de la proliferación celular que no va acompañada de la extensión de neuritas. Sin embargo, desde el punto de vista bioquímico el RA produce efectos que coinciden con los causados por los agentes que inducen diferenciación neuronal. Así, el RA produce un aumento de la expresión del gen del receptor de baja afinidad de las neurotrofinas, una inducción transitoria del gen que codifica la tirosina hidroxilasa (un importante marcador de las células del linaje simpato-adrenal), o una inducción del gen de la transina (implicada en la degradación de la matriz extracelular necesaria para la extensión de neuritas) que son muy similares a las inducidas por el NGF y en algunos de estos casos el oncogén *ras*. Adicionalmente, el RA modula la respuesta de los "genes tempranos" *Egr-1* y *N10* a NGF y a *ras*. Estos genes parecen ser de los primeros que se inducen directamente tras la incubación con agentes mitogénicos o neurotróficos. También hemos demostrado que en las células tratadas con RA se produce un aumento de la liberación de factores de crecimiento al medio de cultivo que son capaces de afectar la proliferación de células epiteliales. De entre estos factores se ha conseguido identificar un aumento en la expresión del gen que codifica el TGF $\beta$ 1 tras la incubación de células PC12 con RA o NGF. Los retinoides también producen una inhibición de la velocidad de crecimiento del neuroblastoma humano SH-SY5Y que se acompaña de un aumento en la expresión de los receptores para la neurotrofina BDNF (el oncogén *trk B*) y de la expresión del gen de RAR $\beta$ 2. Otros factores de crecimiento (como el IGF-1) son mitogénicos en estas células. Hemos podido demostrar la existencia de altos niveles funcionales de receptores de vitamina D3 en este neuroblastoma y en el neuroblastoma de ratón N2A. La vitamina D3 parece tener un efecto antiproliferativo en estas células. Estamos estudiando la regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación celular (oncogenes *fos*, *jun* y *myc* y otros "genes tempranos") por los diferentes ligandos de la familia de receptores nucleares, así como su interacción con factores neurotróficos y mitogénicos y el oncogén *ras* en las células de neuroblastoma.

## **Publicaciones**

P. Pérez, T. Palomino, A. Schönthal and A. Aranda (1994) Determination of the promoter elements that mediate repression of c-Fos gene transcription by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 135-140.

J. Brtko, A. Pascual and A. Aranda (1994) 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptors and their role in the thyroid hormone action. *Endocrine Regulations* 28, 107-115.

A. Aranda (1995) Regulación de la expresión génica por los receptores nucleares. En "Tratado de Medicina Interna" sección de Biología Molecular. (Rodés, Guardia. eds)

A. Sanchez-Pacheco, T. Palomino and A. Aranda. (1995) Negative regulation of the expression of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 by thyroid hormone through interference with promoter enhancer elements. *Mol.Cell.Biol.* 15, 6322-6330.

A. Sanchez-Pacheco, T. Palomino and A. Aranda. (1995) Retinoic acid induces expression of the transcription factor GHF-1/Pit-1 in pituitary growth hormone and prolactin-producing cell lines. *Endocrinology* 136, 5391-5398.

J.M. Cosgaya and A. Aranda. (1995) Nerve Growth Factor regulates transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms in PC12 cells. *J. Neurochem.* 65, 2484-2490.

## **Tesis doctoral**

Jose Miguel Cosgaya. "Interacción del ácido retinoico con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el oncogén ras en la proliferación y diferenciación de las células PC12. Directora: Ana Aranda. Universidad Autónoma de Madrid. 1995.

## **Palabras clave.**

Hormonas tiroideas, ácido retinoico, vitamina D<sub>3</sub>, receptores nucleares, células hipofisarias, diferenciación neuronal, transcripción génica.

## **Rutas de transmisión de señales reguladas por factores de crecimiento y oncogenes. Efectos bioquímicos y biológicos.**

Investigador Principal: Juan Carlos Lacal Sanjuán, Investigador Científico

Becarios Postdoctorales: Amancio Carnero Moya (hasta Sept-95)  
Benilde Jiménez Cuenca (hasta Dic-94)

Becarios Predoctorales: Pilar Esteve Pastor (Dr. a partir de Sep-95)  
Luis del Peso Ovalle  
Nieves Embade Urrutia  
Silvia Montaner Salas  
Rubén Hernández Alcoceba (desde Feb-95)  
Luisa Lucas Parras (desde Sep-1995)  
Conchita Suárez García (desde Oct-1995)

Personal de Apoyo: M<sup>a</sup> Angeles Ramos García

Colaboraciones: Rosario Perona, Inst. Investigaciones Biomédicas, Madrid  
Andrew Wyllie, Univ. Edimburgo, Escocia  
Santiago Ramón y Cajal, Clínica Puerta de Hierro, Madrid  
Silvia Stable, Max-Planck-Gesellschaft, Colonia, Alemania  
Javier León, Universidad de Cantabria  
Antonio Espinosa, Universidad de Granada  
Miguel Fernández Braña, Laboratorios Knoll, Madrid

Nuestro grupo investiga los mecanismos de transmisión de señales activados tras la estimulación mitogénica por factores de crecimiento y la transformación celular inducida por oncogenes. Dedicamos especial atención a los mecanismos en los que participan las proteínas de la superfamilia Ras, en particular miembros de las familias humanas de proteínas Ras y Rho (incluyendo Rho, CDC42 y Rac). Ambas familias pertenecen a la superfamilia de GTPasas monoméricas, caracterizadas por su capacidad de unir e hidrolizar GTP. La unión a GTP induce un cambio conformacional en estas proteínas que favorece su interacción con los efectores, mientras que la hidrólisis del GTP y su conversión en GDP produce un complejo inactivo. Este mecanismo permite su participación como interruptores moleculares en la regulación de importantes respuestas celulares como la proliferación y diferenciación celular.

Los estudios de nuestro grupo han demostrado la importancia de la activación del metabolismo de fosfolípidos en la transmisión de señales mitogénicas tanto en células normales estimuladas por factores de crecimiento como en células transformadas por oncogenes *ras*. Uno de los hitos más relevantes consiste en la activación de una fosfolipasa D, con la generación de segundos mensajeros involucrados en la transmisión de la señal al núcleo (PA, DAG y PCho). Hemos demostrado que la participación de una PC-PLD es un fenómeno específico de la estimulación mitogénica de determinados factores y oncogenes, con la generación de PA, DAG y PCho.

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que de forma semejante a lo descrito para los genes *ras*, los genes *rho* tienen capacidad transformante en su forma mutada actuando como oncogenes en células NIH 3T3, aunque con menor potencia que los genes *ras*. La PC-PLD se encuentra constitutivamente activada en células transformadas por genes *ras* y genes *rho*, siendo probablemente este un proceso necesario para la transformación. El estudio

anatomopatológico de los tumores inducidos por células transformadas por oncogenes *rho* nos ha permitido establecer también su actividad inductora de apoptosis tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, actividad que no se manifiesta en las líneas transformadas por oncogenes *ras*. El análisis de este proceso en las líneas transformadas nos ha permitido identificar parte de la maquinaria de transmisión de señales utilizada por las proteínas Rho tanto en la transformación tumoral como en la inducción de apoptosis. La cascada de señales activada en células transformadas por genes *rho* incluye, además de la fosfolipasa D específica para fosfatidilcolina (PC-PLD) una esfingomielinasa, con la generación de ceramidas. Ambas señales, producción de ceramidas y apoptosis, se bloquean en presencia de suero, sugiriendo que las ceramidas constituyen una señal esencial para la inducción de apoptosis por proteínas Rho. Nuestros resultados sugieren que la inducción de proliferación o apoptosis puede estar relacionada con la activación de rutas específicas de señales intracelulares en las que los derivados de la PC-PLD o la esfingomielinasa jugarían un papel crítico en la modulación de la respuesta.

Por último, hemos establecido una línea de investigación de las rutas de señalización intracelular utilizadas frecuentemente por diversos oncogenes y estamos utilizando esta información para el diseño de drogas antitumorales que afecten selectivamente a los enzimas involucrados.

## Publicaciones

Carnero, A, Dolfi, F. and Lacal, J.C. (1994) *ras*-p21 activates phospholipase D and A2 but not phospholipase C or PKC in *Xenopus laevis* oocytes. J. Cell. Biochem. 54: 478-486.

Carnero, A., Cuadrado, A., del Peso, L. and Lacal, J.C. (1994) Activation of type D phospholipase by serum stimulation and *ras*-induced transformation in NIH 3T3 cells. Oncogene 9, 1387-1395.

Carnero, A., Jiménez, B. and Lacal, J.C. (1994). Progesterone but not *ras* requires MPF for *in vivo* activation of MAPK and S6 KII. MAPK is an essential connexion point of both signalling pathways. J. Cell. Biochem. 55: 465-476.

Lacal, J.C., and A. Carnero (1994). Regulation of Ras proteins and their involvement in signal transduction pathways. Oncology Reports 1: 677-693.

Marchetti, E., Romero, J., Sánchez, R., Vargas, J.A., Domínguez, C., Lacal, J.C. and Ramón y Cajal, S. (1994). Oncogenes and Cellular sensitivity to radiotherapy. A study on murine keratonocytes transformed by *v-H-ras*, *v-myc*, *v-neu*, adenovirus E1A and mutant p53. Int. J. Oncology 5: 611-618.

Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. and Lacal, J.C. (1995). Generation of Phosphorylcholine as an essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors-induced mitogenic stimulation. J. Cell Biochem. 57: 141-149.

Sánchez-Prieto, R., Vargas, J.A., Carnero, A., Marchetti, E., Romero, J., Durantez, A., Lacal, J.C. and Ramón y Cajal, S. (1995). Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. Int. J. Cancer 60: 235-243.

Carnero, A. and Lacal, J.C. (1995). Activation of intracellular kinases in *Xenopus laevis* oocytes by *ras*-p21 and phospholipases: a comparative study. Mol. Cell. Biol. 15: 1094-1101.

Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sánchez, R., Ramón y Cajal, S., Wyllie, A., and Lacal, J.C. (1995) Induction of apoptosis in NIH 3T3 cells by *rho*-p21, a GTPase protein of the *ras* superfamily. *Oncogene* 10, 811-816.

Montaner, S., Ramos, A., Perona, R., Esteve, P., Carnero, A. and Lacal, J.C. (1995). Overexpression of PKC $\zeta$  in NIH 3T3 cells does not induce cell transformation nor tumorigenicity and does not alter NF  $\kappa$ B activity. *Oncogene* 10, 2213-2220.

Carnero, A., Liyanage, M., Stabel, S. and Lacal, J.C. (1995). Evidence for different signalling pathways of PKC $\zeta$  and *ras*-p21 in *Xenopus* oocytes. *Oncogene* 11, 1541-1547.

Esteve, P., del Peso, L. and Lacal, J.C. (1995). Induction of apoptosis by *rho* in NIH 3T3 cells requires competence and progression signals. Ceramides function as a progression factor for *rho*-induced apoptosis in NIH 3T3 cells. *Oncogene* 11, 2657-2665.

Jimenez, B., R.P. Ballester, y J.C. Lacal. (1994) Bases moleculares del Cáncer: oncogenes y genes supresores. En "Cuadernos en Biología Molecular". (M. Vicente, editor). CSIC, Madrid, España.

Cuadrado, A., Carnero, A., and Lacal, J.C. (1994) Activación diferencial de fosfolipasa D en la regulación del crecimiento celular normal o tras la transformación por oncogenes *ras*. En "Monografías Dr. Antonio Esteve nº 15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica". (G. Capellá, M. Hernández-Bronchud y F. Lluís, eds.), pp. 19-29, Barcelona, España.

Carnero, A., Cuadrado, A., Dolfi, F., Jiménez, B., del Peso, L., Esteve, P., Montaner, S., Embade, N., Ramos, A. and Lacal, J.C. (1994). Regulation of phospholipid metabolism by Ras proteins. En "GTPase-Controlled Molecular Machines", Ares Serono Symposia Series, (L. Birnbaumer, D. Corda and A. Luini, eds), pp 321-340. Raven Press New York, USA.

Lacal, J.C. (1995). Comunicación intercelular. Proteínas G. Investigación y Ciencia, abril 1995 pag. 35-36. Barcelona, España.

J.C. Lacal (1995). Fronteras de la Ciencia y la Tecnología 10, 32-34. CSIC, Madrid.

J.C. Lacal (1995). Mecanismo de activación celular en células normales y transformadas por oncogenes. Seminario Médico 47, 55-66. Instituto de Estudios Giennenses, Diputación Provincial de Jaén, Jaén, España.

### **Tesis doctorales**

Amancio Carnero Moya. Estudio de las alteraciones en el metabolismo fosfolipídico mediadas por oncoproteínas p21-*ras*. Director Juan Carlos Lacal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. 1994.

M<sup>a</sup> Pilar Esteve Pastor. Función dual de las proteínas Rho como reguladores de la proliferación y de la apoptosis. Director Juan Carlos Lacal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. 1995

**Palabras Clave.**

Cáncer, oncogenes, factores de crecimiento, Ras, Rho, fosfolipasa D, proliferación, transformación, apoptosis

## **Regulación de la expresión del gen de la proteína $\beta$ -amiloide**

Investigador principal: Angel Pascual. Investigador Científico

Becaria pre-doctoral: María Jesús Latasa

Becaria post-doctoral: Purificación Lledó (Enero-Junio 94)

## **Regulación de la expresión del gen del precursor de la proteína $\beta$ -amiloide**

(María Jesús Latasa, Purificación Lledó y Angel Pascual)

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa de origen multifactorial, que se caracteriza por la presencia de depósitos amiloides en zonas específicas y vasos sanguíneos del cerebro. El componente principal de estos depósitos es siempre una pequeña proteína (39-43 aminoácidos), que se genera a partir de una proteína precursora (APP) de tamaño muy superior. En realidad se trata de una familia de proteínas que se generan por procesamiento alternativo a partir de un único gen localizado en el cromosoma 21 humano. Hasta la fecha se han descrito un total de ocho isoformas diferentes, de las cuales sólo tres (770, 751 y 695 AAs) son mayoritarias y detectables en la práctica totalidad de los tejidos estudiados. La sobreexpresión de este precursor parece contribuir de forma muy especial al desarrollo de la enfermedad, y por ello nos hemos interesado en el estudio de los mecanismos y factores implicados en la regulación de su síntesis.

Nosotros nos hemos planteado el estudio de su regulación en células en cultivo de origen neuronal y glial, y en una primera aproximación hemos analizado los niveles basales de expresión de APP en las líneas celulares N2A (neuroblastoma de ratón), C6 (glioma de rata), SH-SY5Y (neuroblastoma humano) y PC12 (feocromocitoma de rata). Los resultados ponen de manifiesto una buena expresión de mensajero en células PC12, una menor aunque adecuada expresión en células SH-SY5Y, y unos niveles muy bajos de mensajero en las líneas N2A y C6.

Basándonos en datos teóricos obtenidos a partir de la secuencia del promotor, nos hemos planteado el estudio de los efectos inducidos por el ácido retinoico y otras hormonas que como las hormonas tiroideas y la vitamina D<sub>3</sub>, ejercen su acción a través de la gran superfamilia de receptores nucleares, así como los ejercidos por diferentes factores de crecimiento, especialmente aquéllos que como el NGF actúan a través de su unión a receptores con actividad tirosina quinasa. El ácido retinoico y la vitamina D<sub>3</sub> tienen un efecto positivo sobre la expresión del gen APP, aumentando ligeramente los niveles de mRNA en células C6 y SH-SY5Y, mientras que las hormonas tiroideas parecen inhibir esta expresión en células N2A cuando se sobreexpresa su receptor. Por otra parte no se observa ningún tipo de cooperación entre las distintas hormonas estudiadas. El efecto de los diferentes factores de crecimiento se ha estudiado, hasta el momento, solo en células PC12, y SH-SY5Y. En células PC12, el NGF, al igual que otros factores como el b-FGF, o el EGF, inducen un incremento en los niveles del mensajero de APP, a través de un mecanismo en el que estaría implicada la vía ras. En células SH-SY5Y también se observa esta inducción aunque es menor que la observada en PC12.

A otro nivel, y dado el interés que para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer puede tener la proporción relativa de isoformas conteniendo (770,751 aminoácidos), o no (695), un fragmento tipo Kunitz (inhibidor de proteasas), se está tratando de identificar y cuantificar las distintas isoformas de RNA mensajero y proteína en cada una de las situaciones estudiadas. En concreto se está estudiando una posible inducción específica de las formas 770, 751 y 695 por parte de los factores estudiados. Podría ocurrir que sin modificarse los niveles de mRNA total, se estuvieran modificando las proporciones relativas de las mismas. Mediante

técnicas de PCR hemos podido comprobar la presencia de las tres isoformas (770, 751 y 695) de mRNA en células de origen neuronal. Por el contrario la banda correspondiente a la banda de 695 prácticamente desaparece en las células C6 de origen glial. Más aún, hemos detectado la presencia de un triplete en la zona correspondiente a la banda de mayor tamaño, lo que podría implicar la existencia de dos nuevas isoformas del mensajero de APP.

### **Publicaciones**

J.Brtko, A.Pascual and A.Aranda. (1994) 3-5-3'-triiodothyronine nuclear receptors and their role in the thyroid hormone action. *Endocr. Regulations* 28, 107-115.

### **Palabras clave**

Proteína precursora  $\beta$ -amiloide, gen, RNA mensajero, cultivos celulares, factores de crecimiento, hormonas, receptores nucleares, receptores-tirosina quinasa, oncogén ras.

## **Factores de transcripción específicos de tejido en el control hormonal de la expresión génica, la proliferación y la diferenciación celular.**

Investigadora principal : Pilar Santisteban, Colaboradora Científica.

Becarios pre-doctorales : Pedro Aza Blanc (hasta abril de 1994)  
Alvaro Acebrón Fernández (hasta diciembre de 1994)  
Dévora L. Rossi (hasta julio de 1994)  
Purificación Ros  
Antonio de la Vieja (desde enero de 1995)  
Lourdes Ortiz Hernández  
Ana Merino Sancho  
Isabel Barroso Rodríguez

Personal de apoyo : Carmen A. Domínguez ( de Mayo-1994 a Mayo-1995)  
Mercedes Navarrete (desde Junio 1995)

### **Papel de la fosforilación de factores de transcripción específicos de tejido en la mecanismo de transactivación de genes tiroideos.**

(Alvaro Acebrón., Ana Merino y Pilar Santisteban en colaboración con el Dr. Jorge Martín IIB y el Dr. Roberto Di Lauro, Stazione Zoologica A. Dohrn )

El factor de transcripción específico de tiroides TTF-1 (Thyroid Transcription Factor -1) se une a los promotores de los genes tiroideos Tiroglobulina (Tg), Tiroperoxidasa (TPO) y Receptor de Tirotropina (R-TSH) induciendo su transcripción. TTF-1 es homeoproteína que juega un papel decisivo en la determinación del fenotipo tiroideo diferenciado. Hemos demostrado que es una proteína que se fosforila solamente en residuos de serina, y que tiene que estar fosforilada para que sea activa. Nuestro esfuerzo se ha centrado en encontrar un papel funcional a la fosforilación. Para ello en primer lugar hemos mapeado las serinas que se fosforilan y por mutagénesis y delecciones hemos hecho construcciones para estudiar el papel funcional de cada una de ellas. Los datos han indicado que la fosforilación no afecta a la capacidad de unión de la proteína al DNA y que posiblemente sea la capacidad transactivadora de la proteína la que se vea afectada.

Parte de estas conclusiones se han obtenido de los trabajos desarrollados en una línea de células tiroideas transformadas con Harvey-ras que no expresan fenotipo tiroideo diferenciado y en las que el factor TTF-1 presenta un patrón de fosfopéptidos distinto del patrón de la proteína endógena de células normales. Sin embargo aún no entendemos de que manera la fosforilación afecta a la actividad transactivadora de la proteína, por lo que seguimos centrados de lleno en este estudio.

Puesto que la función tiroidea está regulada principalmente por TSH y por IGF-I estamos estudiando la ruta de transducción de señales (cAMP/PKA, PKC, MAPK) implicadas en la fosforilación y por tanto activación del factor TTF-1.

## **Factores de transcripción constitutivos y específico de tiroides en la regulación hormonal de la expresión génica.**

(Pedro Aza-Blanc, Lourdes Ortiz y Pilar Santisteban)

La transcripción de los genes Tg, TPO está regulada hormonalmente por TSH/AMPC y por insulina/IGF-I. Hemos demostrado que la actividad de estos 3 promotores está inducida por las anteriores hormonas, segundos mensajeros y factor de crecimiento. El efecto se ejerce por inducción del factor de transcripción tiroides-específico TTF-2 actuando el elemento de unión a TTF-2 como un elemento de respuesta a hormonas. Este factor ha sido parcialmente clonado por el Dr. R. Di Lauro (Nápoles, Italia), resultando ser un factor de transcripción perteneciente a la familia de factores con un dominio *fork head*. Estamos estudiando la regulación hormonal de este factor.

Sin embargo para que el sitio de unión de TTF-2 actúe como elemento de respuesta a hormonas necesita una posición precisa en el entorno del promotor y próximo a un factor de transcripción constitutivo que hemos identificado como un factor de la familia CTF1/NF1. Estamos estudiando la hipótesis de que el factor TTF-2 y NF-1 interaccionen para activar la transcripción en este sistema.

## **Función de los factores de transcripción específicos de tiroides en la proliferación de células tiroideas.**

(Dévora Rossi y Pilar Santisteban)

El factor TTF-1 junto con el factor Pax-8 (un gen con dominio *paired-box*) son los responsables del fenotipo tiroideo diferenciado. Además de tener un papel en fenómenos de diferenciación, nosotros hemos demostrado que esos dos factores juegan un papel decisivo en la proliferación de células tiroideas. Células en las que se bloqueó su expresión con oligonucleótidos antisentido disminuyeron su crecimiento en respuesta a hormonas y factores de crecimiento. Estamos estudiando cual sería el papel de TTF-1 y Pax-8 en el ciclo celular de esta células.

## **Implicación de los factores específicos de tiroides en patología tiroidea humana.**

(Purificación Ros y Pilar Santisteban)

Hemos demostrado que la falta de expresión del factor de transcripción TTF-1 es la causa de un bocio congénito familiar con defecto de síntesis de Tg. Queremos ampliar este estudio a nuevos bocios congénitos familiares y otros tipos de defectos congénitos tiroideos.

El hecho de que los factores TTF-1, TTF-2 y Pax-8 regulen los genes específicos de tiroides y que sean en última instancia los responsables de la función tiroidea diferenciada nos llevó a estudiar la expresión de estos genes en neoplasias tiroideas humanas. Hemos demostrado la falta de expresión de estos factores en carcinomas tiroideos anaplásicos y es posible que en un futuro la expresión de estos factores sea usada como diferenciadora entre adenomas bien diferenciados y carcinomas indiferenciados.

## **Requerimientos estructurales de la molécula de tiroglobulina.**

(Antonio de la Vieja y Pilar Santisteban)

Estamos finalizando el proyecto iniciado por el Dr. Luis Lamas sobre relaciones estructura-función en la molécula de Tg. Se han construido plásmidos a partir del cDNA de Tg de rata correspondiente al extremo N-terminal (5') del gen de Tg y otras construcciones correspondientes al extremo C-terminal (3'). Estas construcciones contienen los sitios hormonogénicos definidos anteriormente conteniendo tirosinas aceptoras o donadoras. Estas construcciones se han expresado en *E.Coli* y la proteína expresada se ha iodado *in vitro* y estudiada la formación de hormonas tiroideas. Con ello definiremos los requerimientos estructurales mínimos necesarios para una síntesis eficiente de hormonas tiroideas.

## **Regulación de la expresión génica por insulina: Identificación de elementos en *cis* y *trans* de respuesta a dicha hormona.**

(Isabel Barroso y Pilar Santisteban)

En nuestro intento de estudiar genes regulados por insulina y buscar elementos en *cis* y *trans* que mediasen la respuesta a dicha hormona, hemos demostrado que el gen del enzima málico citosólico (ME) posee un elemento de respuesta a insulina. A dicho elemento se une un factor de transcripción que no hemos identificado aún pero que podría ser el factor Sp-1 o un factor relacionado. La posición de este factor en el promotor de ME cerca de los elementos de respuesta a hormonas tiroideas podría explicar la acción sinérgica de T3 e insulina en la regulación de la expresión génica de ME. Continuaremos estudiando el mecanismo de regulación hormonal de ME y el papel que este gen y los factores de transcripción que lo regulan tienen en el proceso de diferenciación de fibroblastos 3T3L1 a adipocitos así como en hepatocitos de rata. .

## **Publicaciones**

García-Jimenez C., Benito B., Jolin T. and Santisteban P. (1994) Insulin regulation of malic enzyme gene expression in rat liver : Evidence for nuclear proteins that bind to two putative insulin response elements. *Molecular Endocrinology* 8, 1361-1369

Turmo C., Santisteban P., De la Vieja A., Vallés I., Domingo C. and Lamas L. (1994) Evidence for the importance of the disulfide bonds and sulphhydryl groups of thyroglobulin on thyroid hormonogenesis. *Endocrinología*, 41, 8-12

Santisteban P., Acebrón A. and Aza-Blanc P. Hormonal control of thyroid-specific transcription factors. En " *Biotechnology : Gene Expression* " . Houlaki G and Vassaroti A.(Eds.) Commission of the European Communities. pp 78-79 (1994)

Santisteban, P.(1994) Mecanismos reguladores de la transcripción. En " *Proliferación celular y cancer* " Cascales, M. & Rodriguez Villanueva, J. (Eds) Real Academia de Farmacia y Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cancer. pp 179-236

Santisteban P. Activación génica y factores de transcripción (1995) *Investigación y Ciencia* 224, 38-39. Barcelona (España)

Rodríguez M., Rodríguez F., Jolin T. and Santisteban P. (1995) Comparative effects of food restriction, fasting, diabetes and thyroidectomy on growth hormone and thyrotropin gene expression in rat pituitary. *European Journal of Endocrinology* 133, 110-116

Acebrón A., Aza-Blanc P., Rossi D., Lamas L. and Santisteban P. (1995) Congenital human thyroglobulin defect due to low expression of the thyroid specific transcription factor TTF-1. *Journal of Clinical Investigation* 96, 781-785.

Rossi D., Acebrón A. and Santisteban, P. (1995) Function of the homeo and paired domain proteins TTF-1 and Pax-8 in thyroid cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 23139-23142

Santisteban, P. (1995) Hormonal regulation of thyroid-specific genes transcription. En. "*Selective gene activation by cell type specific transcription factors*" Serie Universitaria, Fundación Juan March pp 16-17. Madrid.

P. Santisteban. (1995) Los pasos desde la membrana al núcleo: sistemas de transducción de señales y mecanismos reguladores de la transcripción. En *Anales de la Real Academia de Farmacia* (Apendice 4) pp. 110- 124 . Madrid.

### **Tesis doctorales**

Pedro Aza Blanc. Regulación hormonal y tejido-específica del gen de peroxidasa tiroidea. Directora Pilar Santisteban Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. 1994.

Alvaro Acebrón Fernández. Papel de los factores de transcripción específicos de tiroides en la transcripción basal y en la regulación hormonal del gen de tiroglobulina. Directora Pilar Santisteban. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid 1994.

Dévora L. Rossi. Función de los factores de transcripción TTF-1 y Pax-8 en la regulación de la diferenciación y proliferación celular. Directora Pilar Santisteban. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid 1995.

### **Palabras clave**

Transcripción basal, transcripción específica de tejido, regulación hormonal, cAMP, insulina, IGF-I, expresión génica, células tiroideas, diferenciación.

## **Seminarios de Investigación**

## CONFERENCIANTE

Alarcón, Cristina  
Joslin Diabetes Center  
Boston - USA y  
CIB - CSIC

Antoranz, C.  
Dept. Física Fundamental  
Fac. Ciencias, UNED

Aragay, A.  
California Inst.

Arenas, E.  
Lab. Neurobiología Mol.  
Karolinska Institutet  
Estocolmo

Arrondo, J. L.  
Fac. Ciencias  
U. País Vasco - Bilbao

Avila, M.  
IIB

Azorín, F.  
CID - Barcelona

Ballesteros, A.  
Inst. Catálisis y Petroleoquímica  
Campus UAM - Madrid

Barettino, D.  
EMBL - Heidelberg, Alemania

Bartolomé Seguí  
CBM UAM-CSIC

Bemain, G.  
Univ. Central Venezuela

Bernabeu, C.  
CIB - Madrid

## SEMINARIO

Regulación de la biosíntesis y procesamiento de insulina.

Proyecto B.C.M., diseño y construcción de un ventrículo artificial neumático.

Procesos de transducción de señales medidas por las proteínas G: Gp y G12.

Regulación y función de las neurofinas en el sistema nervioso central.

Estructura de proteínas estudiada por espectroscopia IR.

Implicación de los glicosilfosfatidil inositoles en la señalización intracelular de las neurotrofinas.

Polimorfismo estructural del DNA. Propiedades del microsátélite d(Tc).

Biocatálisis aplicada: Un gran reto científico.

Regulación de la transcripción por los receptores de hormona tiroidea y ácido retinóico.

Una nueva vía de transporte de proteínas a la vacuola de levadura: transporte directo de aminopeptidasa .

Mecanismo de regulación de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.

Endoglina/CD105, un receptor para TGF-B presente en células monocíticas.

Cachon, B. Nat. Inst. Med. Res. Londres y Dept. Fisiol. Fac. Med. U. Valladolid	El gen hairless de ratón y su homólogo humano.
Caelles, C. Univ. California San Diego - USA	Inducción de apoptosis por agentes que causan daño al DNA celular: Papel de la proteína supresora de tumores p53.
Calvo, V. Harvard Univ. Boston, USA	Papel de la MAP-quinasa y S6-quinasa en la activación de linfocitos-T.
Crespo, P. Nat. Inst. Dental Res. NIH. Bethesda. USA	Mecanismos de activación de MAP quinasa por receptores acoplados a proteínas G.
Díaz, F. Scripps Res. Inst. San Diego. USA	Efecto dominante negativo del cambio conformacional de integrinas.
Dominguez, A. Dept. Microbiología Univ. Salamanca	Dimorfismo en Yarrowia.
Enjuanes, L. CNB - Madrid	Tropismo, evolución y protección en coronavirus.
Esteban, M. CNB - Madrid	Estructura y función de la proteína quinasa p68 inducida por el interferón.
Evans, P. R. MRC Lab. Mol. Biology Cambridge - U.K.	Phosphofructokinase: structure, catalysis and regulation.
Fagin, J. Cedars Sinai Med. Center Los Angeles - USA	Genética molecular de los tumores de tiroides.
Fernandez Luna, J.L. Serv. Inmunología Hosp. Marq. Valdecilla Santander	Expresión y función de Bcl-2 y Bcl-X en la diferenciación mielóide.
Fernandez Salguero, P. National Cancer Inst. NIH - Bethesda - USA	Papel del receptor de dioxina (Ah receptor) en el mantenimiento del sistema inmune mediante "gene knock-out".

<p>Fernandez, V. Fernandez  Inst. Catálisis y Petroleoquímica  Campus UAM - Madrid.</p>	<p>Inmovilización orientada de enzimas para  el desarrollo de biosensores.</p>
<p>Fernandez-Tresguerres, J.  Cat. Fisiol. y Endocr. Exper.  Fac. Med. UCM</p>	<p>Modificaciones morfo-funcionales de la glándula  parótida sometida a la influencia de hormonas  hipotalámicas.</p>
<p>Ferrús, A.  Inst. Cajal - Madrid</p>	<p>Organización funcional del complejo génico  Shaker de Drosophila.</p>
<p>Gabius, H-J.  Inst. Phys. Chemie  Ludwig-Maximilians Univ.  Munich - Alemania</p>	<p>Lectins and glycobiology:  from lab bench to clinics.</p>
<p>García Bustos, J.F.  CNB - Madrid</p>	<p>Transmisión de señales vía inositoles  en el núcleo celular.</p>
<p>García López, J.L.  CIB - Madrid</p>	<p>Biología molecular de las enzimas líticas de  Pneumococo y sus bacteriófagos.</p>
<p>García Segura, L.M.  Inst. Cajal. CSIC Madrid</p>	<p>Hormonas gonadales como inductoras  de plasticidad neuronal.</p>
<p>Garcia, A.  Dept. Farmacología  Fac. Med. - UAM</p>	<p>Calcio y exocitosis.</p>
<p>García-Ballesta, J. P.  CBM - Madrid</p>	<p>Regulación de la actividad ribosómica  Un nuevo mecanismo de control  post-transcripcional de la expresión  génica en eucariotes.</p>
<p>Gasparovick, C.  Univ. New Mexico  Albuquerque</p>	<p>NMR studies of water transport in  red blood cells.</p>
<p>González Sarmiento, R.  Fac. Medicina  Univ. Salamanca</p>	<p>Caracterización de nuevos protooncogenes  implicados en translocaciones cromosómicas.</p>
<p>Gómez Muñoz, A.  Fac. Medicina  U. Alberta. Canada</p>	<p>Regulación de la transducción de seña  les por esfingolípidos.</p>
<p>Goñi Urcelay, F. M.  Depto Bioq. y Biol. Mol.  Fac. Ciencias - UPV</p>	<p>Fusión de liposomas inducida por fosfolipasa C:  un modelo de fusión de membranas.</p>

González Crespo, S.  
U. California San Diego  
CBM - Madrid

Inmunidad y polaridad embrionarios  
procesos evolutivamente relacionados.

González, M.  
Intern. Center Cancer & Develop.  
Biology. Fac. Med. Univ. Chile

MIP-90, una nueva proteína que interactúa con  
microtúbulos y filamentos de actina.

González-Castaño, J.  
Dept. Bioquímica  
Fac. Med. - UAM

Proteasoma: estructura, función y  
modulación.

Goya, L.  
Inst. Bioquímica CSIC  
Fac. Farmacia, UCM  
Madrid

Efecto de los glucocorticoides sobre el  
crecimiento de células procedentes de tumor  
de glándula mamaria. Papel del TGF.

Gutiérrez Merino, C.  
U. Extremadura  
Badajoz

Relaciones estructura-función en la  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$   
ATPasa del retículo sarcoplásmico del  
músculo esquelético de conejo.

Herrera, E.  
Cent. Ciencias Exper. y Tecn.  
U. San Pablo-CEU. Madrid

Metabolismo lipídico en la gestación.

Howard Evans, W.  
Col. Medicine  
Univ. Wales

Molecular and functional anatomy of gap  
junction intercellular signalling channels.

J. Frampton  
EMBL - Heidelberg

Role of v-Myb in differentiation, growth  
control and survival of haematopoietic cells

Jorcano, J.L.  
CIEMAT - Madrid

1) ¿Están implicadas las keratinas en el control  
del ciclo celular? 2) Fenotipo en piel debido  
al bloqueo de la función del receptor de  
EGF por un mutante dominante negativo  
en ratones transgénicos.

Kaplowitz, N.  
Div. Gastrointestinal & Liver  
Dis. U. South Cal. Med. Center  
Los Angeles. USA

The cloning and characterization of  
plasma membrane GSH transporters.

Kopecky, J.  
Inst. Physiology  
Czech Acad. of Sciences. Praga

Obesity-resistant transgenic mice with  
modified mitochondria in white fat.

Lazo, P. A. Unid. Genética Molecular C.N.Biol. Cel. Retrovirus Inst. Salud Carlos III Madrid	Antígeno CD53: regulador de producción de óxido nítrico y prototipo de una nueva familia de proteínas de membrana.
León, J. Dept. Bioq. y Biol. Mol. Fac. Medicina Universidad de Cantabria - Santander.	El complejo Myc/max en la diferenciación y apoptosis de células de leucemia mieloide
Leone, A. Inst. Oncológico Bari - Italia	Molecular mechanism of tumor invasion and metastasis: Role of nm23 gene.
López Carrascosa, J. CNB - Madrid	Estructura y función del sistema de empaquetamiento de DNA viral.
López Farré, A. Fund. Jiménez Díaz Madrid	Implicación de agentes vasoactivos liberados por el endotelio en la relación existente entre las células que comprenden el microentorno vascular.
López-Barahona, M. Bristol Myers-Squibb Pharmac. Res. Institute Princeton - USA	TC21: una nueva GTPasa que puede activar una ruta de transformación diferente a ras.
Malpartida, F. CNB - Madrid	De la genética a la Biología Molecular de la producción de antibióticos.
Marín, J. Cat. Farmacología Fac. Medicina - UAM	Mecanismos implicados en las relajaciones endotelio dependientes. ¿Explican los diversos efectos vasculares del esteroide anabolizante nandrolona?
Martín Nieto, J. Kansas State Univ.	Disección funcional del gen codificador de la proteína ribosómica humana S14.
Mayor Menéndez, F. CBM - Madrid	Mecanismos de regulación de receptores de membrana plasmática.
Miras Portugal, M.T. Dept. Bioquímica Fac. Veterinaria. UCM	Los diadenosinapolifosfatos, nuevos transmisores del sistema purinérgico.
Moscat, Jorge CBM - Madrid	z-PKC y señalización mitogénica.

- Oliver, S.G.  
Dept. Biochemistry &  
Applied Molecular Biol.  
UMIST. Manchester. U.K.
- Olson, M.  
Dept. Biochem. U. Texas  
Health Science Center  
San Antonio - USA
- Pascual Leone, A. M.  
Inst. Bioquímica - UCM  
Madrid
- Peinado, M. A.  
Inst. Recerca Oncològica  
Hosp. Duran y Reynals  
Barcelona
- Peral Fuentes, B.  
Inst. Mol. Medicine  
John Radcliffe Hosp.  
OXFORD - Gran Bretaña
- Perez, P.  
Bristol Myers-Squibb Pharm. Res.  
Int. Princeton USA
- Phon Too  
Dept. Quim. Biol. Farm. Mol.,  
Fac. Med.  
Univ. Harvard, USA
- Pinazo, M.D.  
Cent. Invest. "La Fé"  
Inst. Invest. Citológicas  
Valencia
- Planas, A.  
Dept. Farmacología  
CID-CSIC, Barcelona
- Portela, A.  
Inst. Salud Carlos III
- Ramón y Cajal, Santiago  
Dept. Anat. Patológica  
Clin. Puerta de Hierro  
Madrid
- Chromosome transactions and genome evolution.
- The role of lipid and peptideautocoid mediators in the regulationof hepatic responses to trauma.
- Desarrollo en mamíferos: Mecanismos endocrinos moleculares y subnutrición.
- Papel de la inestabilidad genética en la progresión tumoral.
- Identificación del gen que causa poliquistosis renal en el adulto.
- IK B es el principal inhibidor de la actividad NFkB en timocitos.
- Perspectives of a family of neuropeptides: Tachykinins.
- Mecanismos de defensa frente a los radicales libres en el globo ocular.
- Isquemia cerebral: cambios en la expresión génica. Inhibición de la síntesis proteica y muerte celular
- Análisis de las proteínas implicadas en la transcripción y replicación del genoma del virus de la gripe.
- Oncogenes y resistencia a agentes antitumorales.

Rausell, E.  
Dept. Anatomía/Morfología.  
Facultad Medicina - UAM Madrid

Bases estructurales y plasticidad de  
la representación somatosensorial  
en el sistema nervioso adulto.

Reinoso, F.  
Dpt. Morfología  
Fac. Medicina - UAM

Neurobiología del sueño.

Rodríguez Navarro, A.  
ETS Ingenieros Agrónomos  
Madrid

Transportes de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en hongos

Rodríguez-Peña, M.A.  
Fac. Medicina  
U. Cantabria - Santander

El complejo Myc/max en la diferenciación  
y apoptosis de células de leucemia mieloide.

Rodríguez-Tébar, A.  
Inst. Neurobiología Ramón  
y Cajal-CSIC - Madrid

Moléculas inductoras de la morfogénesis  
retiniana.

Rozengurt, E.  
Imperial Cancer Res. Found.  
Londres - U.K.

Señales tempranas de activación celular:  
Fosforilación en tirosina por receptores  
acoplados a proteínas G.

Ruiz-Argüero, T.  
Cat. Microbiología  
Dept. Biotecnología  
ETS Ingen. Agrónomos-UPM

Genética molecular del sistema de oxidación  
de hidrógeno en *Rhizobium* y nódulos de  
leguminosas.

Saéz Castresana, J.  
Mass. Gen. Hospital  
Harvard Medical School

Identificación de mutaciones en genes  
tumorales mediante PCR-SSCP (single-strand  
conformation polymorphism).

Sánchez- Madrid, F.  
Cat. Inmunología UAM  
Hosp. de la Princesa

Polarización celular y redistribución  
de moléculas de adhesión durante la interacción  
de linfocitos con el endotelio.

Serrano Salom, R.  
Inst. Biol. Mol. Cel. Plantas  
UPV. Valencia

Tolerancia a salinidad: un proyecto urgente en  
la era de la agricultura molecular.

Shoorlemmer, J.  
CIB - Madrid

Characterization of a negative retinoic acid  
response element in the murine Oct 4 promoter.

Simons, K.  
EMBL - Heidelberg

Molecular dissection of polarized membrane  
traffic in epithelial cells.

**Patrocinado por ITISA**

Valverde, M. A.  
Agricultural/Food Res. Council,  
Cambridge, U.K.

Valencia, A.  
CNB - Madrid

Wojtczak, L.  
Nencki Inst. Exp. Biology  
Warsaw - Polonia

Regulación del volumen celular:  
Función fisiológica de la glicoproteína

Bioinformática: nuevos desafíos en Biología.

Intracelular calcium and the Crabtree effect.

## **Cursos impartidos**

**Cursos impartidos**  
**(Programa de Doctorado del Departamento de Bioquímica)**

**Curso 94-95**

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular I                         | C. Gancedo<br>J. Renart           |
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular II                        | A. Sillero<br>J. Gonzalez-Castaño |
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular III                       | L. Sastre<br>M. Fernandez         |
| - Seminarios de Bioquímica, Biología Molecular y Celular                          | J. Renart<br>R. Garesse           |
| - Symposium de Oncogenes V  | J.C. Lacal<br>R. Perona           |
| - Aplicación de métodos informáticos al análisis de secuencias de DNA y proteínas | J.R. Valverde<br>J. Renart        |
| - RMN en Medicina y Biología  | S. Cerdan                         |
| - Bases Moleculares de la Patología   | J.E. Feliu<br>J. Gonzalez-Castaño |

**Curso 95-96**

- |   |                           |
|---|---------------------------|
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular I   | J.J. Aragón<br>A. Coloma  |
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular II  | C. F. Heredia<br>R. Marco |
| - Bases bioquímicas y moleculares de la función celular III | S. Mazón<br>J.E. Feliu    |

- Seminarios de Bioquímica, Biología  
Molecular y Celular

J. Renart  
A. Muñoz  
R. Garesse

## Otros Cursos

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| - Curso de operadores de instalaciones radiactivas                             | L. Sastre<br>M.T. Macias         |
| - Simposium de Oncogenes VI  | J.C. Lacal<br>R. Perona          |
| - Biología molecular de receptores neuronales                                  | J. Gonzalez-Castaño<br>J. Renart |
| - Aplicación del HPLC a la Biomedicina   | P. LLorente                      |
| -RMN en Medicina y Biología  | S. Cerdan                        |
| -Genética Humana molecular   | J. Gonzalez-Castaño<br>A. Coloma |
| -Bioquímica, Fisiología y Fisiopatología Endocrina; Hormonas Tiroideas Yodadas | Gabriela Morreale                |

## **Índice alfabético de investigadores**

Alemany, Susana,	35
Aragón, Juan José	95
Aranda, Ana	139
Bernal, Juan	71
Cano, Amparo	15
Cerdán, Sebastián	37
Cervera, Margarita	115
Coloma, Antonio	99
Cruces, Jesús	117
de la Fuente, Gertrudis	101
Eraso, Pilar	57
Escobar del Rey, Francisco	75
Felú, Juan Emilio	101
Fernández de Heredia, Claudio	103
Fernández, Margarita	41
Gancedo, Carlos	59
García-Vallejo, Carmen	119
Garesse, Rafael	121
González-Castaño, José	43
Günther, María Antonia	109
Jolin, Trinidad	11
Lacal, Juan Carlos	143
Lagunas, Rosario	63
Lamas, Luis († 1994)	11
Llorente, Pilar	105
Marco, Roberto	123
Martin, Jorge	49
Mato, José María	45
Mazón, María Jesús	65
Morreale de Escobar, Gabriela	75
Muñoz, Alberto	81
Obregón, María Jesús	85
Pajares, Maria Angeles	45
Pascual, Angel	147
Pérez-Castillo, Ana M <sup>a</sup>	127
Perona, Rosario	19
Pestaña, Angel	21
Portillo, Francisco	67
Quintanilla, Miguel	25
Renart, Jaime	131
Rodríguez-Peña, Angeles	89
Sagarra, Rosa	107
Santisteban, Pilar	149
Sastre, Leandro	133
Sempere, Juana María	61
Sillero, Antonio	109
Varela, Isabel	45

Vara, Francisco	53
Villalobo, Antonio	29
Zaera, Eulalio	109

## **Indice de palabras clave**

acetil-CoA sintetasa, 111  
 ácido ocaico, 51  
 ácido retinoico, 91, 141  
 actina, 135  
 adenilación de proteínas, 32  
 adenosina 5'-tetrafosfato, 111  
 adhesión celular, 18  
 adipocitos marrones, 87  
 adoMet descarboxilasa, 35  
 adoMet sintetasa, 35  
 agentes de contraste para MRI, 40  
 anticuerpo monoclonal, 27  
 AP-1, 84  
 apoptosis, 19, 51, 132, 145  
*Artemia*, 104, 106, 111, 135  
 arteria, 107  
 ATP sintetasa, 122  
 ATPasa, 135  
 atrofia muscular espinal, 118  
 $\beta$ -ATPasa, 120  
 Baf-3, 51  
 Bcl2, 132  
 c-fos, 51  
 c-jun, 51  
 c-myc, 51  
 c-src, 51  
 cadherina, 18, 27  
 calcio, 32, 102, 135  
 caliculina, 51  
 calmodulina, 32  
 cAMP, 152  
 canales intercelulares, 32  
 cáncer, 135  
 carcinogénesis, 18, 27  
 carcinoma mamario, 18  
 cardiovascular riesgo, 107  
 caseína kinasa I, 42  
 cateninas, 18  
 CEF, 51  
 células hipofisarias, 141  
 células tiroideas, 152  
 células tumorales, 32  
 centrómeros, 118  
 cerebro, 74, 80, 84, 130  
 CFTR, 57, 68  
 ciclos inútiles, 62  
 clonación posicional de genes, 100  
 coenzima Q, 107  
 conexinas, 32  
 conservación de secuencias, 100  
 cot quinasa, 35  
 criptobiosis, 135  
 crustáceos, 135  
 desarrollo, 48, 130, 135  
 desyodasas, 87, 130  
 diadenosina tetrafosfato, 111  
*Dictyostelium discoideum*, 97  
 diferenciación, 27, 42, 84, 91, 141, 152  
 dinucleósido polifosfatos, 111  
 distrofias musculares recesivas, 118  
 DNA mitocondrial, 120, 122  
*Drosophila melanogaster*, 118, 122  
 efluentes peritoneales, 54  
 endocitosis, 64  
 enfermedades hereditarias, 118  
 enzimas mitocondriales, 120  
 enzimopatías, 102  
 epidermis, 27  
 epitelio de mama, 84  
 esfingolípidos, 48  
 Espectroscopia de Resonancia Magnética (MRS), 40  
 Est quinasa, 35  
 estrés, 19  
 estructura-función, 57, 66, 68  
 excitotoxicidad, 132  
 expresión génica, 120, 130, 135  
 factores de crecimiento, 54, 145, 148  
 factores de transcripción, 18, 62  
 ferrosfatasas, 106  
 feto, 80  
 folatos, 48  
 fosfocalmodulina, 32  
 fosfofructokinasa, 97  
 fosfolipasa D, 145  
 fosforribosiltransferasa, 106  
 fructosa-1,6-bisfosfatasa, 62  
*Fusarium*, 104  
 genes tempranos, 130  
 genes, 74, 84  
 Genética Humana, 100  
 genoma, 60  
 genotecas genómicas, 100  
 glía, 84  
 glicolisis, 60, 97, 104  
 gluconeogénesis, 62, 97  
 glucosamina, 104  
 glucosil-fosfatidilinositol, 102  
 glutamina, 97  
 glutatión, 48  
 H<sup>+</sup>-ATPasa, 57, 68  
 H-ras, 27

*Helix pomatia*, 111  
 hepatocitos, 51, 102  
 hibridación in situ, 74  
 hibridoma, 97  
 hipotiroidismo, 74  
 homocisteína, 48  
 hormona tiroidea, 74, 84, 87, 91, 130  
 IGF-I, 152  
 Imagen por Resonancia Magnética (MRI), 40  
 inactivación catabólica, 64  
 inhibición enzimática, 111  
 inhibidor-2, 51  
 inositol fosfoglicanos, 48  
 insulina, 152  
 interleuquina-2, 35  
 interrupción genética, 66  
 invasión y metástasis, 18, 27  
 Iodo, 80  
 islas CpG, 118  
 K562, 51  
 L-5178-Y, 106  
 lactasa intestinal, 97  
 Lesch-Nyhan, síndrome de, 106  
 leucemia, 106  
 levadura, 60, 62, 104  
 linfocitos T, 35  
 lipoproteínas, 107  
 luciferasa, 111  
 lupus eritematoso, 43  
 macrófagos y peritonitis, 54  
 MACs, 118  
 mapa de transcripción, 120  
 Max, 51  
 médula adrenal bovina, 111  
 MER 30, 118  
 MERRF, 122  
 metabolismo cerebral, 40  
 metabolismo del agua, 40  
 metaloproteasas, 18  
 metotrexato, 106  
 microsatélites marcadores, 118  
 mielina, 91  
 mitocondria, 120, 122, 130  
 músculo, 116  
 mutaciones, caracterización, 100  
 mutagénesis dirigida, 57, 66, 68  
 neonato, 80  
 neuroblastoma, 91  
 neurogranina, 74  
 neurotrofinas, 91  
 nucleósidos, 106  
 nucleótido fosfohidrolasa, 104  
 oligodendrocitos, 91  
 oncogén *erbA*, 84  
 oncogenes, 19, 145  
 patología mitocondrial, 122  
 peritoneo, poblaciones celulares, 54  
 pH interno, 19  
 poliglutamilación, 106  
 progresión tumoral, 18  
 proliferación celular, 19, 48, 51  
 promotores génicos, (análisis), 74, 147  
 promotores mitocondriales, 120, 122  
 proteasomas, 43  
 protein kinasas mitocondriales, 120  
 protein kinasas, 42, 51  
 proteína quinasa C, 132  
 proteína precursora  $\beta$ -amiloide, 148  
 proteínas estructurales, 118  
 proteínas fosfatasa, 51  
 proteínas membrana plasmática, 64  
 proteínas quinasas, 51  
 proteólisis, 64  
 Proyecto Genoma, 100, 118  
 queratina, 27  
 quimeras, 66  
 radicales libres, 107  
 Ras, 145, 148  
 RC3, 74  
 recambio de proteínas, 64  
 receptor de EGF, 32  
 receptores de glutamato, 132  
 receptores de neurotrofinas, 91  
 receptores de T3, 130  
 receptores de TGF $\beta$ , 32  
 receptores nucleares, 74, 84, 91, 141, 148  
 receptores-tirosina quinasa, 148  
 regulación alostérica, 97  
 regulación expresión génica, 130  
 regulación hormonal, 152  
 regulación por glucosa, 57, 68  
 represión catabólica, 62  
 resistencia a insulina, 102  
 resistencia celular, 106  
 Rho, 145  
 RNA 12S, 120  
 RNA mensajero, 148  
 RNA polimerasa, 120  
 RNAs mitocondriales, 120  
 S-adenosilmetionina sintetasa, 48  
 S-adenosilmetionina, 48

*Saccharomyces cerevisiae*, 62, 64, 97, 104  
señalización celular, 42  
secuenciación DNA, 66  
secuencias alfoide, 118  
segundos mensajeros, 48  
sodio, 135  
sondas moleculares de pH y pCa, 40  
sulfonilureas, 102  
supresión intragénica, 57, 68  
T3, 80, 87  
T4, 87  
termogenina (UCP), 87  
termorresistencia, 106  
TGF $\beta$ , 27  
*Thamnocephalus platyurus*, 111  
thyroxine, 80  
tirosina quinasas, 32  
tocoferol, 107  
tranportes de azúcares, 64  
transcripción, 120, 141, 152  
transformación oncogénica, 51  
transporte hexosas, 104  
trehalosa-6-fosfato, 60, 62  
triyodotironina, 80, 87  
trkB, 91  
tumor ascítico, 97  
ubiquinol, 107  
uniones intercelulares comunicantes, 32  
vitamina D3, 141  
vitamina E, 107  
YACs, 118  
YCF, 57, 58

## **Summary**

## **Department of Molecular and Cellular Biology of Cancer**

### **Role of E cadherin and P cadherin in tumor progression. Regulation of the expression and function of both cell-cell adhesion molecules.**

Group leader: Amparo Cano

Our studies on the implication of E cadherin (ECD) and P cadherin (PCD) in tumor progression are based in the experimental model of mouse skin carcinogenesis where we are specifically interested in the molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of the expression and functional activity of both molecules, as well as in the characterization of the anti-invasive role of ECD. On the other hand, we are also analysing the potential prognostic value of both molecules in several models of human carcinomas. Our specific research lines are the following:

- Regulation of ECD and PCD gene expression during tumor progression in mouse skin carcinogenesis. Analysis of promoters.
- Modulation of the functional activity of ECD in tumor progression. Role of plakoglobin and  $\alpha$ -catenin.
- Role of ECD in the invasion and metastatic processes. Relationship with oncogenic Ha-ras dosage.
- Influence of the p53 gene product in the expression of ECD, PCD and integrins during malignant progression (papilloma-carcinoma transition).
- Expression of ECD and PCD in breast carcinoma and basal cell carcinoma.

### **Role of intracellular pH in transformation and stress responses.**

Group leader: Rosario Perona

Changes in intracellular pH are involved in cellular proliferation in response to mitogens. Our interest has been focussed in the determination of the signal transduction pathways activated by the gene of a yeast proton pump ATPase (*PMA-1*) whose expression in NIH3T3 cells is able to induce morphological transformation. Expression of the *PMA-1* gene induces activation of the c-fos and c-jun promoters. Activation of the c-fos promoter is mediated through the serum response element and of the c-jun promoted is mediated by the JUN1 and JUN2 sites of the promoter. On the other hand exposure of cells to UV light triggers a transcriptional response mediated partially by the jun/ATF-2 transcription factors. The activation of c-jun is carried out by a serine threonine kinase, named JNK. Inhibitors of the sodium proton antiporter are able to block of activation of JNK induced by several agonists. We are actually investigating which element of the pathway activated by stress is pH dependent.

### **Malignant progression in mouse skin carcinogenesis.**

Group leader: Miguel Quintanilla

Research topics:

- Identification of tumor antigens induced in malignant progression by the production of monoclonal antibodies.
- The growth factor TGFbeta as a modulator of the epithelial phenotype in carcinoma cells. Implications in invasion and metastasis.

- Role of E-cadherin in the metastatic ability of carcinoma cells. Correlation between the metastatic potential and H-ras oncogene expression.
- Analysis of cadherin expression as a marker of progression in carcinomas.
- Effects of the adenovirus E1A gene expression in the differentiation of carcinoma cells and sensitivity to chimio- and radio-therapy.

### **Intercellular communication in normal and tumoral cells.**

Group leader: Antonio Villalobo

Our group is interested in the mechanisms involved in intercellular communication between normal cells and their alterations in tumor cells. Among the studies in progress are: i) The effect of nitric oxide on cell proliferation and its inhibitory action on the transphosphorylation and tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor, ii) The control of the epidermal growth factor receptor by calmodulin and phosphocalmodulin, iii) The expression of transforming growth factor  $\beta$  and their receptors in tumor cells, iv) The phosphorylation of connexin-32 by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its effect, v) The role of connexin-32 phosphorylation on its turnover, and vi) The function of plasma membrane adenylylated proteins from normal and tumor cells.

## Department of Molecular and Cellular Biology of Signal Transduction

### Role of Est kinase, AdoMet synthetase and AdoMet decarboxylase in T cell activation.

Group leader: Susana Alemany.

Studies in our laboratory have shown that the mRNA levels of the protooncogene est kinase are increased after T lymphocyte activation. We have also detected that T cell transfection with the oncogenic form of the kinase (cot kinase), increases the release of IL-2, these data implicated est kinase in IL-2 secretion.

On the other hand we have demonstrated that the expression of the g AdoMet synthetase and AdoMet decarboxylase genes are induced during T lymphocyte activation as a consequence of the interaction of IL-2 with its high affinity receptors, while AdoHcy hydrolase mRNA levels remain unchanged. Further studies with inhibitors indicate, that the induction of  $\gamma$  AdoMet synthetase mRNA levels is tightly related to lymphocyte proliferation.

### Magnetic Resonance in Biology and Medicine

Group leaders: Sebastián Cerdán  
Paloma Ballesteros

Research topics:

Water structure and function in biological systems.

We are studying the transport, metabolism, physical properties and structure of water in various biological systems using NMR methods. The residence time of water is approximately 30 s in the perfused liver, 10 ms in rat erythrocytes and < 0.1 ms in rat liver mitochondria. The effective viscosity of the cytosol is approximately twice that of distilled water and the effective viscosity of the mitochondria is fifteen times larger than that of the cytosol.

Quantitative approaches to cerebral metabolism.

We have studied quantitatively the metabolism of glucose in primary cultures of neurons and astrocytes and compared it with metabolism of the neuronal and glial compartments of the intact brain.

Hormonal regulation of cerebral metabolism.

We have shown that adult onset hypothyroidism markedly affects the cerebral metabolism in the neuronal and glial compartments of the intact brain, altering mainly the relative exchange of glutamate, glutamine and GABA between the neuronal and glial compartments.

Magnetic resonance of neurodegenerative disorders.

We are currently analyzing the metabolic alterations induced during Focal Cerebral Ischemia (FCI) and reperfusion in the ischemic and contralateral hemispheres. In addition, a pattern recognition algorithm based on the analysis of neural networks is being developed for the automatic diagnosis of cerebral tumors by  $^1\text{H}$  NMR.

Novel molecular probes for diagnosis by MRS and MRI methods.

We have synthesized a novel series of pH probes and Gd chelating agents for  $^1\text{H}$  MRI diagnosis. We are also developing a strategy to apply molecular dynamic calculations to predict pharmacological activity.

## **Cloning and Expression of a Casein Kinase I in *Dictyostelium discoideum*.**

Group leader: Margarita Fernández.

Research topics:

Cloning and expression of a casein kinase I from *Dictyostelium discoideum*.

Our main goal is to study the function of this kinase in *Dictyostelium* cells, We have already cloned a truncated version of casein kinase I, the 5 prime has been localized by anchored PCR, we are searching for the 3 prime end of the gene. We have also performed studies of gene expression. This gene is expressed in large amounts late in differentiation. Although the level of expression is very low in vegetative asynchronously growing cells, in a synchronous population differences can be detected in its expression during the cell cycle. We have also generated antibodies against the amino terminal portion of the protein, and we are going to perform immunofluorescence studies. We are planning to perform overexpression and truncation experiments in *Dictyostelium* cells to study the phenotype of the transformed cells.

Activation of MAP and Raf kinase and Protein kinase C in response to different stimuli. .

We have been studying the activation of MAP and Raf kinase and Protein kinase C in response to different stimuli such as PDBu or interleukine 2. In the primary culture these enzymes are not activated in response to IL2, but they are activated in response to the phorbol ester. The Map kinase activation is the limiting step in the transition G1/S triggered by PDBu. Raf activation ( measured as hiperphosphorylation) is required for proliferation but is not required for MAP kinase activation.. We are currently studying the putative role of two protein phosphatases acting on phosphorylated MAP kinase to terminate the signal.

## **Metabolic regulation**

Group leaders: José M. Mato  
Isabel Varela  
María A. Pajares

Research topics:

Alterations of methionine metabolism in hepatic diseases.

Regulation of S-adenosylmethionine synthesis.

Structure of S-adenosylmethionine synthetase.

Regulation of betaine: homocysteine methyltransferase.

Signal transduction mediated by lipids

Our work is aimed to determine the structure and biological actions of the mammalian inositol phosphoglycan (IPG) involved in signal transduction of the insulin family of factors, and to develop synthetic methods to obtain biologically active analogues of potential therapeutical interest. The basic mechanisms through which these molecules act will be studied. In this respect it will be investigated: 1) The role of IPG as a transducing signal for neuroendocrine hormones such as insulin and related insulin-like factors; 2) The role of IPG and IPG-analogues on the modulation of the expression of specific genes during cell growth and embryonic development; 3) Modulation by growth factors of the synthesis and turnover of glycosyl-phosphatidylinositol, the cellular IPG precursor. We are also investigating on the regulation of cell activation by sphingolipids. In particular, we are interested in the role of ceramides and ceramide

phosphates in controlling cell proliferation and apoptosis. Ceramides can induce cell differentiation and are potent inhibitors of cell growth. In contrast, we have observed recently that ceramide phosphate stimulates DNA synthesis and cell division. An immediate objective of our work is now to determine the mechanism(s) whereby these effects are brought about *in vivo* and in cells in culture.

### **Protein phosphorylation in cellular signaling.**

Group Leader:           Jorge Martin

Protein phosphorylation, a mechanism of post-translational modification with relevant implications in many pathways of cellular signalling, is controlled by the counter-balance between the relative activities of protein kinases and phosphatases. We have studied the role of protein kinases and phosphatases in a variety of cell signalling mechanisms, including oncogenic transformation, apoptosis and proliferation. At the present time, our main emphasis is centered in gaining some understanding of the role play by the Src family of tyrosine kinases in the cellular mechanisms of signal transduction induced by prolactin.

### **Mitogenic Activities in the Peritoneal Effluent of Patients Treated with Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (C..A.P.D.).**

Group leader:           Francisco Vara

Resesarch Topics:

Presence of Different Mitogenic Activities in the Peritoneal Effluent of Patients on CAPD.

Cell Populations Present in the Peritoneal Effluent of Patients on CAPD.

Peritoneal cells in CAPD patients are in continuous process of regeneration. We have described that NPE is mitogenic on human and mouse fibroblasts in culture, especially when a comitogen is present. The nature, origin and role of this mitogenic activity remains undetermined. The data following to dialysis process and different comitogen additions suggest that the peritoneal effluent contains different growth factors greater than 10000 daltons. Also, the presence of a growth inhibitor is plausible. In conclusion, different growth-promoting and inhibiting activities are present in peritoneal effluent, suggesting a complex cellular relationships as result of peritoneal dialysis with unknown consequences.

## Department of Biochemistry and Genetics of Yeast

### Molecular analysis of ionic transporters in yeast.

Group leader: P. Eraso

Research topics:

Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose

New residues having an important role in the H<sup>+</sup>-ATPase regulation by glucose have been identified using site-directed mutagenesis. A point mutation at the regulatory domain (H914Y) results in a fully activated enzyme which is able to eliminate both the lack of growth and the defect of ATPase activity of the double mutant S899A,T912A. Thr-912 is an essential residue for glucose activation of H<sup>+</sup>-ATPase and forms part of a potential phosphorylation site for Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase. We have investigated the role of some calmodulin antagonists on glucose activation of H<sup>+</sup>-ATPase.

Structure-function relationship study on CFTR protein by directed mutagenesis and intragenic suppression analysis

FQ mutations are being created by site-directed mutagenesis in YCF, the yeast homologue of CFTR protein, to isolate and identify intragenic suppressor mutations.

### Control of glycolytic flux in yeast

Group leader: C. Gancedo

Research topics:

Control of glycolytic flux in yeast

We characterized the mutation *DGT1-1* (previously named *SMUI*). The corresponding gene regulates the expression of several genes related to sugar transport in yeast and the mutation obtained abolishes catabolite repression. A suppressor of the mutation *tps1* turned out to be *CAT3*.

We have developed an enzymatic assay method for the quantitative determination of trehalose-6-phosphate using purified hexokinase from the yeast *Yarrowia lipolytica*.

Sequencing of the yeast genome

Within the frame of the European programme of sequencing the whole yeast genome we have continued the sequence of a region of chromosome XV. We have identified in the left arm of this chromosome near the telomere several new ORFs not previously characterized.

### Regulation of the expression of gluconeogenic genes in yeast.

Group leader: Juana M. Gancedo

Regulatory elements for the transcription of the *FBP1* gene from *S. cerevisiae* have been characterized. The purification of proteins involved in transcriptional activation is in progress. Regarding the post-transcriptional regulation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase, domains of the protein related to catabolite inactivation have been investigated and a new allosteric regulatory mechanism, inhibition by trehalose-6P has been uncovered. Yeast strains

have been constructed to study the physiological significance of the different regulatory mechanisms of fructose-1,6-bisphosphatase. It can be concluded that the selective advantage conferred by these mechanisms is smaller than expected but sufficient to allow the rapid replacement of an unregulated strain by a regulated one. The study of mutants which affect the expression of a variety of enzymes subject to catabolite repression has been followed up.

### **Mechanism of glucose transport in yeast.**

Group leader: R. Lagunas

Research Topics:

Mechanism of glucose transport in yeast.

It has been reported that the low-affinity component of the glucose transport in yeast is due to passive diffusion. We have found that the permeability coefficient of hexose in this organism is, at least, two to three orders of magnitude lower than required to account for this component and have concluded that it is not due to passive diffusion.

Mechanism of catabolite inactivation of plasma membrane proteins.

Catabolite inactivation of the transporters of the plasma membrane has been investigated using the maltose transport as an experimental model. We have found that this inactivation requires internalization by endocytosis, occurs in the vacuole and is independent of function of the proteasome and of the cAMP-dependent protein kinase.

### **Sequencing of the yeast genome**

Group leader: Maria J. Mazón.

Research topics:

Yeast Genome Sequencing Project

The nucleotide sequence of a fragment from the left arm of chromosome VII has been determined. Analysis of the sequence revealed nine complete ORFs and two incomplete ones. Five of these ORFs have been selected for phenotypic analysis and studies on gene expression and function.

Structure-function relationship study on Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) protein by directed mutagenesis and intragenic suppression analysis

Chimeric genes between the CFTR protein and its yeast homologue, YCF1, will be constructed to study the effect of cystic fibrosis (CF) mutations and to isolate and identify intragenic suppressor mutations.

### **Molecular Analysis of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase**

Group leader: Francisco Portillo

Research Topics:

Genetic Analysis of the ATP Binding Site of the Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase.

The highly conserved motif of H<sup>+</sup>-ATPase <sup>474</sup>KGAP has been proposed to participate in the formation of the phosphorylated intermediate during the catalytic cycle. We have performed an intragenic suppressor analysis of the K474R mutation to identify the interacting regions involved in this function. One suppressor mutation (V396I), located 18 residues away from the Asp-378 residue, which phosphorylates during

catalysis, is allele-specific. This provides genetic evidence of a direct interaction between the KGAP motif and the phosphorylation domain during the catalytic cycle. Three mutations (V484I, V484I/E485K and E485K/E486K) may compensate the structural alteration introduced by the K474R mutation. Three substitutions (A165V, V169I/D170N and P536L) may act as allele-nonspecific suppressors.

Cloning and characterization of genes involved in the glucose-dependent expression of the ATPase gene (PMA1).

The expression of PMA1 is regulated by glucose. We have isolated mutations on seven genes that affect this regulation. One of these genes (APA1) was cloned by complementation and shown to encode a protein with six putative transmembrane stretches. Deletion of APA1 affects the expression of several glucose-inducible genes. These results suggest a model in which Apa1 acts on a glucose-signaling pathway.

## **Department of Molecular Endocrinology**

### **Expression of brain genes regulated by thyroid hormone**

Group leader: Juan Bernal

Research topics:

- Regional specificity of thyroid hormone on RC3 expression.
- Distribution of T3 receptors in brain and colocalization with T3-sensitive genes
- Hormonal regulation of RC3 in GT1-7 cell cultures
- Identification of regulatory sequences in the RC3 gene
- Expression patterns and hormonal regulation of a novel striatal-specific gene

The goals of our work are the identification of brain genes dependent of thyroid hormone, and the study of the mechanism of thyroid hormone action. The best studied so far is RC3/neurogranin. It encodes a 78-aminoacid protein located in the dendritic spines of cerebral neurons and it is not expressed in cerebellum. The protein is a calmodulin binding, PKC substrate presumably involved in synaptic plasticity. Expression of the gen is under tight control by T3 in layer VI of cerebral cortex, retrosplenial cortex, caudate nucleus and dentate gyrus of the hippocampus. Al these regions, which express RC3 after postnatal day 10, are dependent of thyroid hormone. Other regions, such as layers II-III of cerebral cortex, habenular nucleus, CA fields of hippocampus, amygdala, or medial geniculate nucleus are insensitive to T3. To study the determinants of T3 sensitivity we have studied the colocalization of RC3 with T3 receptor variants in sensitive and insensitive cells. The results are that sensitivity to T3 is not determined by differential distribution of receptors. On the other hand, we have found that the GT1-7, hypothalamic cell line express very low levels of RC3 mRNA but that the addition of T3 results in a fast (4 hours) and robust (20-fold at 24 hours) increase of RC3 mRNA. The effect is probably mediated directly by the T3-receptor complex since the T3 response is not inhibited by cycloheximide. Furthermore, GT1-7 cells express high levels of functional T3 receptors, as assessed by T3 binding assays and reporter gene induction by endogenous receptors. Despite this, the RC3 promoter is not responsive to T3 which raises the possibility of T3-responsive elements located in region of the gene different from the promoter.

### **Production and action of thyroid hormones at different stages of development**

Group leader for maternal-fetal communication: G. Morreale de Escobar

Research topics:

- Thyroid hormones in early embryonic compartments
- Alterations of thyroid hormone transport, induced with a synthetic flavonoid, and consequences for the maternal and fetal thyroid hormone status.
- Effects of the herbicide nitrofen on maternal-fetal communication and pulmonary immaturity.
- Brain damage in progeny of severely iodine deficient rats: audiogenic seizures
- Brain damage in Thyroid hormone receptor b null mutant mice: audiogenic seizures.

Group leader for extrathyroidal adaptations to thyroid hormone deficiency and excess: G. Morreale de Escobar

Research topics:

Thyroid hormone status in thyroidectomized rats on different T4 doses: euthyroidism of all rat tissues is not attained simultaneously with any dose.

Thyroid hormone status in thyroidectomized rats on different T3 doses: euthyroidism of all rat tissues is not attained simultaneously with any dose.

Thyroid hormone status in thyroidectomized rats on different combinations of T4 + T3: euthyroidism attained in all tissues.

Homeostasis of T3 in the adult cerebral cortex.

Group leader for iodine deficiency studies: Dr. F. Escobar del Rey

Research topics

Situation of iodine nutrition in different areas of Spain.

Iodine nutrition in schoolchildren of the Community of Madrid.

Iodine deficiency in premature infants

Iodine deficiency in pregnant and lactating women.

Experimental iodine deficiency disorders: threshold for brain damage.

### **Effects of the c-erbA and v-erbA genes and of thyroid hormone on cell growth and differentiation**

Group leader: Alberto Muñoz

Research topics:

Effects of erbA genes and of thyroid hormone on glial cells

Regulation of the brain-specific prostaglandin D2 synthetase gene by thyroid hormone

Effects of erbA genes and of thyroid hormone on mammary epithelial cells

Search for brain genes regulated by thyroid hormone

Our group is focussed on the study of the biology of the erbA genes. We are analyzing the effects of c-erbA and v-erbA on the growth and differentiation, phenotype and gene expression of normal, non-tumorigenic cell lines of glial (B3.1) and mammary epithelial (EpH4) origin. On the other hand, we are searching for new genes regulated by c-erbA and its ligand thyroid hormone (T3). To this, genomic and differential display PCR approaches have been performed. A series of genes have been found that are transcriptionally regulated by erbA/T3 during rat brain development. In addition, we are studying the regulation by T3 of the prostaglandin (PG) D2 synthetase gene. The product of this gene is the enzyme responsible for the synthesis of PGD<sub>2</sub>, the major PG in the brain which is involved in the control of functions such as body temperature and the sleep-wake cycle. We have characterized a T3-regulatory element in the promoter region of the PGD<sub>2</sub> synthetase gene, and in situ hybridization and immunohistochemistry analyses have confirmed the control by T3 in vivo.

### **Regulation of brown adipocytes proliferation and differentiation. Regulation of deiodinase activity by thyroid hormones.**

Group leader: María Jesús Obregón

Proliferation of brown adipocytes in primary culture. The mitogenic effects of growth factors, vasopressin and norepinephrine (NE) on brown preadipocytes are studied.

The regulation of the UCP gene in brown adipocytes by NE, thyroid hormones and glucocorticoids is examined at the promoter level, and the regulation of UCP mRNA

expression.

Regulation of 5'Deiodinase (5'D-II) and 5 Deiodinase (5D) activities in brown adipocytes.

The adrenergic stimulation of 5'D-II is potentiated by T3, while 5D activity is increased by several growth factors, as well by thyroid hormones and NE.

Regulation of nuclear T3 receptors (TR) mRNA in brown adipocytes.

T3 increases beta-TR mRNA species while insulin decreases alfa and beta-TR mRNAs.

Regulation of 5'Deiodinase activity in rat tissues by thyroid hormones. 5'Deiodinase activities has been examined in tissues from fetal and neonatal rats undergoing diabetes and undernutrition, flavonoids administration or iodine deficiency, or in adult rats replaced with T4 or T3.

### **Regulation of nerve cells differentiation and neuro-specific promoters expression by nuclear receptors.**

Group leader: Angeles Rodriguez-Peña

The role of thyroid hormone and thyroid hormone receptor (TR) expression in the differentiation of nerve cells have been studied in primary cultures of oligodendrocytes progenitors and neuroblastoma cell lines.

We have shown that the generation of oligodendrocytes in vitro predominantly occurs in asymmetric division and differentiation of O-2A progenitor cells, process in which thyroid hormone increase the number of oligodendrocytes per clone, but does not change the timing of appearance.

Two lines of neuroblastoma cell lines differentiation after stable expression of TR have been studied, the N2a and the clones N1 and N7 from the neuroblastoma NB41A. Expression of TR decrease their growth capabilities and induces the expression of the neurotrophins receptor, TrkB.

The activation of two neuro-specific promoters by nuclear receptors have been studied: the myelin basic protein promoter which is activated upon stimulation with thyroid hormone and 9-cis retinoic acid through the same element, and the characterization of the trkB promoter and flanking sequences.

## Department of Enzymology and Molecular Pathology

### Control mechanisms of sugar metabolism

Group Leader : Juan J. Aragón

Research topics:

Molecular bases of the allosteric control of phosphofructokinase (PFK) of eukaryotic cells.

To this aim, we use PFKs from *Dictyostelium discoideum*, a non allosteric isozyme, and ascites tumor cells, a regulatory one. The cDNA of *D. discoideum* PFK was expressed in a PFK<sup>-</sup> strain of *Saccharomyces cerevisiae* and the recombinant enzyme purified in the amount of milligrams, thus enough for the production of mutant forms by specific manipulation of the sequence. The full-length cDNA of PFK-C from ascites tumor has been isolated and residues proposed for the catalytic and regulatory sites were located in the amino acid sequence.

Metabolism of glutamine and glucose in hybridoma cells. The metabolism of glutamine and glucose is being investigated in hybridoma cells for the evaluation of their metabolic fates, their capacity as energy substrates and the possibility of interaction between both of them.

Utilization of galactosylxyloses in the evaluation of intestinal lactase *in vivo*. 2- 3- and 4- Galactosylxyloses have been synthesized enzymatically and proved to be hydrolyzed *in vivo* by rat intestinal lactase after oral administration of the disaccharide and measurement of xylose in the urine by a simple colorimetric procedure. Xylose elimination correlated with lactase activity when evaluated along growth of suckling animals. This method can be of application to the diagnosis of lactase deficiency in humans, with particular interest in pediatrics because of its simplicity and apparent innocuousness.

### **Human Molecular Genetics. The search and identification of human genes. Characterization of new mutations causing hemophilia B in the spanish population.**

Group Leader: Antonio Coloma

Research topics:

The interest of our laboratory is focused on the characterization of new human genes, as a contribution to the Genome Project, as well as on the improvement of the molecular diagnostics of recessive hereditary diseases by characterization of novel mutations causing disease in families that are noninformative by RFLP analysis.

Our work on new human genes has consisted on the contribution to the identification of the Diastrophic Dysplasia gene, completed in 1994 in Eric Lander's lab, the search of the Spinal Muscular Atrophy gene, already identified by others in 1995, and the identification of the gene encoding human neurogranin (RC3), a neuronal protein which is a substrate of protein kinase C. Concerning the molecular diagnostics aspects, we have described 10 novel point mutations on the factor IX gene causing hemophilia B in Spanish families.

## **Hormonal Regulation of Metabolism**

Group Leader: Juan Emilio Felú

Research topics:

Actions of sulfonylureas in extrapancreatic tissues.

Glycosyl-phosphatidylinositol signalling system and insulin resistance.

Diagnosis of inherited metabolic diseases related to carbohydrate metabolism.

## **Control of expression and modulation of enzyme activities in yeast and *Artemia***

Group Leader: Claudio Fernandez de Heredia

Research topics:

Transport of hexoses in yeast. The constitutive transport of hexoses in yeast has been re-examined with a new radioactive experimental approach devised to distinguish between association or independence of the transport step with phosphorylation of the sugar substrate. Our results with wild-type *Saccharomyces cerevisiae* support the view that the transport of hexoses in yeast does not involve phosphorylation of the substrate.

Sensitivity of glycolysis to inhibition by glucosamine. Inhibition by glucosamine (a metabolic glucose analogue) of the utilization of hexoses by *Saccharomyces cerevisiae* is induced by growing the cells in media with galactose. The changes that render the cells sensitive to glucosamine, are under the control of the *gal80* and *gal4* genes. The inhibition by glucosamine is pH dependent. Intracellular accumulated glucosamine derivatives impairs the transport of glucose and mannose in galactose, but not in glucose or ethanol, grown yeast, under conditions in which the utilization of these sugars is inhibited.

Synthesis of nucleosides 2'-phosphate. The purification and characterization of the *Artemia* 2',3' cyclic nucleotide phosphohydrolase has been completed

## **Mechanisms of resistance to Metotrexate (MTX) in LLA cells. Enzymology of salvage pathways in differentiation and pathological states.**

Group Leader: Pilar Llorente

Research topics:

Inhibition of FPGS by metabolites of Folic acid and MTX hydrolysis. Pterine and aminopterin analogs, potential hydrolysis products of Folic acid and MTX respectively, have been synthesized and their action on the regulation of the pyglutamylated ( FPGS ) in leukaemic lymphoblasts cells ( L 5178-Y ) has been studied. These molecules are valuable tools for understanding the metabolism of antifolate drugs so as the mechanism (s) of the drugs resistance cellular.

Purine metabolism in HGPRT-deficient patients Studies performed with effectors, Fe<sup>3+</sup> ion , so as specific inhibitors of PNP and phosphatase(s) , support the sequential implication of both enzymatic activities in purine nucleosides PRPP- dependent synthesis , in erythrocytes from HGPRT- deficient patients ( Lesch-Nyhan syndrome ). This metabolic pathway may be an alternative route for hypoxanthine salvage and / or purine nucleotide formation in HGPRT-deficient erythrocytes.

Thermal stability of *Artemia* HGPRT: effect of substrates on inactivation kinetics.

In this work, we have carried out a study on HGPRT from *Artemia* cysts in order to further investigate the effect of temperature on the activity and enhancement of its thermostability.

### **Nonenzymatic antioxidant levels in blood and arteries related to cardiovascular risk**

Group leader: María Rosa de Sagarra

Research topic:

Ubiquinol is an extremely labile substance. In order to measure ubiquinol levels in surgical tissue samples, a preservation medium has been developed and assayed in guinea pig heart. With this medium, it has been possible to assay ubiquinol and Vitamin E in low density lipoproteins isolated from several blood samples. Due to Hospitalary problems, it has been particularly hard to obtain samples from the hospitals, so that the continuation of the work has been delayed.

### **Metabolism and function of dinucleoside polyphosphates**

Group Leaders: Maria Antonia Günther and Antonio Sillero

Research topics:

Metabolism and Function of dinucleoside polyphosphates (Np<sub>4</sub>N). a) Yeast Acetyl-CoA synthetase catalyzes the synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate; b) Synthesis of labelled Np<sub>4</sub>N has been obtained with firefly luciferase (EC 1.13.12.7); c) Synthesis of diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) with luciferase takes place in the absence of oxygen; d) a non-specific adenylate deaminase from *Helix pomatia* transforms Ap<sub>4</sub>A into diinosine tetraphosphate (Ip<sub>4</sub>I); e) Encysted embryos of *Thamnocephalus platyurus* contain millimolar concentrations of diguanosine tetraphosphate; f) the Ap<sub>4</sub>A, ATP and catecholamines content has been analysed in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells.

Purine nucleotide metabolism. The synthesis of uric acid from purine bases, nucleosides and nucleotides has been measured in rat liver supernatants

Enzyme kinetics. The reservoir model of enzyme kinetic has been applied to intuitively visualise the effect of the different types of reversible enzyme inhibition on the kinetic properties of an enzyme. The relationships between the concentration of an inhibitor producing 50 % inhibition of an enzyme reaction (I<sub>50</sub>) and its inhibition constant has been discussed. A tridimensional representation of enzyme inhibition, useful for diagnostic purposes, has been developed.

## Department of Regulation of Gene Expression

### Regulation of gene expression during development and criptobiosis.

Group Leader: Leandro Sastre

Our group is working on the regulation of transcription during the activation of *Artemia* cryptobiotic embryos (cysts) and their consequent development. *Artemia* cryptobiotic embryos are characterized by the absence of any biological activity, including gene transcription. Their activation involves the resumption of these activities between minutes to a few hours. The study of the regulatory mechanisms that mediate transcriptional activation during this process has been approached through the isolation of a number of genes that are expressed soon after activation of the cysts and the characterization of their promoter regions. Once these promoters have been characterized we will study the mechanisms that regulate their expression. A second approach to the problem is the study of basic transcription factors that could mediate transcriptional activation and/or repression. We have initiated this project through the cloning of the TATA Binding Protein (TBP) and the study of its expression during cyst activation.

This general project has been divided in the following research topics:

- Regulation of the expression of *Artemia* sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase gene.
- Regulation of the expression of *Artemia* Na/K ATPase  $\alpha$ 1 subunit gene.
- Regulation of the expression of three *Artemia* actin genes.
- Structure and expression of *Artemia* TATA Binding Protein (TBP) gene.

### Paramyosin and other muscle proteins in *Drosophila*: Biochemical and Function analysis

Group Leader: Margarita Cervera

Analysis of the *in vivo*  $\beta$ -galactosidase expression has allowed us to identify "minimal" promoters as well as the "complete" promoter sequences that qualitatively reproduce the *in vivo* expression properties of PM and mPM. We are now initiating a more rigorous analysis of the quantitative expression in embryos and larvae by *in situ* hybridization to characterize in detail the different potentially regulatory sequence motives

The study of the TnT promoter has started isolating the genomic clones from *D. melanogaster* and *virilis*. The comparison of both promoters will allow the identification of "putative" functional motifs. We will identify the minimal promoter as well as conserved, known and unknown, specific motifs (E boxes, MEF2 sites, CArgG boxes) in the sequences of both genes.

### Study of genes responsible for inherited neuromuscular diseases in humans. Analysis of human centromeric sequences

Group Leader: Jesús Cruces

Neuromuscular diseases are the main group of inherited diseases affecting humans. Our group' work is focused in two of them. First, the spinal muscular atrophy (SMA), a disorder in which affected individuals present with different degrees of degeneration of the anterior horn neuronal cells. SMA is, after cystic fibrosis, the second most frequent severe recessive genetic disease in humans: 1 in 8-10.000 live births. On the other hand, we are also

characterizing the human homolog of the *Drosophila* recessive muscular dystrophy mutation "rotated". To date, this *D. melanogaster* gene has not correspondence with any characterized human gene. However, given its putative function and the "rotated" phenotype, the human homolog is a good candidate for involvement in human recessive dystrophies.

We are also studying human chromosome centromeric sequences in an attempt to understand the structure and minimal length of sequences required to make a functional centromere, with a final aim of generating mammalian artificial chromosomes (MACs) as possible vectors to introduce foreign genes into human cells, with possible applications in gene therapy. This general project has been divided in the following research topics:

- Spinal Muscular Atrophy: Physical and genetic map of the region of chromosome 5, containing the SMA locus
- Study of alpha satellite DNA at the centromere of human chromosome 7.
- Characterization of the human homolog of the *Drosophila* "rotated" gene

### **Regulation of mitochondrial genes expression during development.**

Group Leader: Carmen G. Vallejo

During the early development of *Artemia* there is an increase in mitochondrial enzyme activities of about one order of magnitude, whereas the activities of two cytoplasmic enzymes tested as controls remain unaltered. The mitochondrial enzyme activation correlates with (i) large changes in mitochondrial morphology, (ii) a 5-fold increase in the amount of the H<sup>+</sup>-ATP synthase  $\beta$ -subunit and (iii) a dramatic increase in the steady-state level of mitochondrial mRNAs, whereas mitochondrial rRNA concentrations remain mostly unchanged. In contrast, the level of mitochondrial DNA does not change significantly during the first 20 hours after resumption of development. After hatching, the mitochondrial DNA content increases twice in parallel with one round of cellular division, thus indicating that mitochondrial and nuclear replication are coupled in mitochondrial postgastrular development. The data presented strongly suggest that mitochondrial maturation in the absence of significant mitochondrial proliferation is responsible for the dramatic increase in mitochondrial function that takes place after resumption of development in *Artemia*.

We have identified the transcription initiation sites and constructed the transcription map of the mitochondrial genome of *Artemia*. By in vitro capping of the nascent RNA 5' ends with guanylyltransferase, two transcription initiation sites have been identified in the heavy strand. The first is located in the 5' end of the 12S rRNA, at one end of the non-coding area, and it is heterogeneous. A second transcription initiation site, less frequently used, occurs at 250 nucleotides upstream from the former. The transcription initiation sites have been mapped by primer extension, S I protection and RNase protection techniques. Regarding the light strand, although the in vitro capping technique has produced no results, it has been possible to identify at least one possible candidate for transcription initiation site. The transcription map has been constructed from results obtained with the Northern hybridization technique using double stranded DNA, RNA and single stranded oligonucleotides as probes. It can be concluded that (i) the *Artemia* mitochondrial genome is transcribed as polycistronic units beginning at one or few promoters, as in other animal mitochondrial systems (ii) the primary transcripts are then processed to render mature transcripts using the tRNAs as processing signals, processing being less efficient in those regions of the genome where a tRNA does not occur, (iii) the heavy strand is transcribed completely, including the main non-coding region from which stable transcripts have been mapped and (iv) the transcription is terminated bidirectionally at the leucine tRNA.

*Artemia* mitochondrial RNA polymerase has been isolated from the first time from an

invertebrate. Mitochondria were purified and the RNA polymerase activity was solubilized and affinity-chromatographed on Heparin-Sepharose. The characterization of the purified preparation indicated that the enzymatic reaction was completely dependent on added DNA and rNTPs and that the reaction products were completely sensitive to RNase. The reaction requires  $Mg^{2+}$ , being  $Mn^{2+}$  an inhibitor as well as the monovalent cations. The polymerase is insensitive to rifampicin and  $\alpha$ -amanitin. Although the characteristics of the isolated polymerase are typical of the mitochondrial enzyme, the in vitro transcription of *Artemia* mtDNA fragments containing the initiation sites turned out to be unspecific. In connexion, the main initiation site was protected from DNase I by the crude but not the purified mitochondrial RNA polymerase preparation. The results altogether suggest that a specificity factor is separated from the catalytic subunit during the chromatography and, since this does not happen in the systems described up to date (yeast and vertebrates), it may be inferred that the specificity factor in invertebrates is of a different nature.

No information is available on the likely role of phosphorylation/dephosphorylation mechanisms in mitochondrial biogenesis, despite the fact that the *Artemia* mitochondrial protein-coding genes contain phosphorylation consensus sites for different protein kinases. Likewise, protein kinases have not been described in mitochondria from invertebrates and there are only a few reports from mammalian mitochondria. As a first approach, we have isolated and characterized two protein kinases in *Artemia* mitochondria, casein kinase II and cAMP-dependent protein kinase. Whereas the first presents the same characteristics of the cytosolic enzyme, the second has a much higher affinity for the specific peptide Kemptide. Each kinase phosphorylate a different set of proteins in *Artemia* mitochondria.

### **Physiopathology of mitochondrial biogenesis**

Group Leader: Rafael Garesse

Mitochondrial diseases are now recognised as a distinct class of disorders, usually degenerative in character, which are associated with mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) mainly affecting muscle and central nervous system. 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. In order to know how nuclear and mitochondrial genes are expressed in physiological and pathological conditions we are using two different approaches: i) using as model system *Drosophila melanogaster* we are studying the promoter of several genes that play a key role in mitochondrial biogenesis. ii) we are studying at molecular level the cellular effects of new mtDNA mutations responsible of human mitochondrial diseases.

### **Genetic and Epigenetic Factors in Arthropod Development and Aging**

Group leader: Roberto Marco

In the first topic, purification and properties of muscle proteins, we have checked the efficiency of new methods of separation of muscle proteins and applied them in arthropods to the identification and study of the calcium binding properties of Troponin T and C. In the second topic, epigenetic modulation of *Drosophila* and *Artemia* development and aging, we have performed several experiments in Space, in the Shuttle Columbia (NASA-ESA) and in Russian biosatellites (Biopan and Foton-10). We have extended the information on the effects of microgravity on *Drosophila* and *Artemia* development, as well as on *Drosophila* aging in close correlation with additional parameters modifying the aging response, such as the

temperature of rearing and selection for differential longevity..The results overall agree with the *rate-of-living* theory of aging but indicates that mitochondrial alteration is only one of the parameters involved in the aging response.In the fourth topic, mitochondrial DNA and phylogenetic studies in *Artemia*. we have completed the identification of the parthenogenetic strains in this genus.

### **Effect of perinatal hypothyroidism on brain development.**

Group Leader: Ana Pérez Castillo

In vertebrates, the thyroid hormone, T<sub>3</sub>, plays a critical role in the development of the central nervous system and its deficiency during the early neonatal period results in severe brain damage. However, the mechanisms involved and the genes specifically regulated by T<sub>3</sub> during brain development are largely unknown. We have identified an early gene: NGFI-A, to be a target of T<sub>3</sub> action. In vivo the expression of this gene is up-regulated by T<sub>3</sub> during brain development. The thyroid hormone receptors α1 and β1 are able to transactivate the NGFI-A promoter independently of ligand. On the other hand, by using a subtractive hybridization technique we have shown that T<sub>3</sub> is an important regulator of mitochondrial gene expression during all the neonatal, and also prenatal, periods of brain development.

Expression of thyroid hormone receptor genes (TRs) and 5' deiodinase activities in the developing pituitary and regulation by T<sub>3</sub>. We have previously shown a regulation of TSH and GH genes by T<sub>3</sub> very early in pituitary development. Now we have studied the developmental profile and regulation by T<sub>3</sub> of the different TRs and the enzyme activities responsible for the plasma and cellular T<sub>3</sub> concentrations. Both TRα and TRβ genes are present very early in development and regulated by T<sub>3</sub>. Type I and type II deiodinase activities have different ontogenic patterns: type II is the predominant activity in fetuses whereas the level of type I increases with age. These results demonstrate that the mechanisms responsible for T<sub>3</sub> action are mature and active very early in development and suggest an involvement of T<sub>3</sub> in the establishment and/or maintenance of the somatotroph and thyrotroph phenotype.

### **Genetic Approaches to the study of signaling pathways in mammalian cells in culture**

Group Leader: Jaime Renart

Research topics:

Obtention of cell lines resistant to the neurotransmitter glutamate. Our main goal is to develop an in vitro excitotoxicity assay to make mutant cell lines resistant to this neurotransmitter. To this end we are obtaining cell lines (derived from the human embryonic kidney cell line HEK293 and from the neuroblastoma N2A) that express different subunits of the NMDA receptor: NR1 and NR2A and NR2C. The expression of the NR2A and NR2C subunits is under the control of a regulated promoter, based on the tetracycline repressor.

Characterization of a cell line that expresses stably the NR1 subunit of the NMDA glutamate receptor. This line was constructed using the neuronal specific enolase promoter, and has two interesting properties: first, the extension of processes in the presence of serum, and second, the overexpression of the immediate early gene NGFI-A. We are currently studying the molecular bases of this phenotype. 3. induction of apoptosis by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. When N2A cells are treated with the specific PKC inhibitors bisindolylmaleimide GF103209X and Gö 6976, apoptosis is triggered. Cells are protected from apoptosis by transfection with the *Bcl2* gene or

when the treatment is done in the presence of calpain I inhibitors. We are currently characterizing this system, as irreversibility of the process, and expression of different genes during the treatment.

## **Department of hormonal regulation**

### **Tissue-specific transcription factors in the hormonal control of gene expression, proliferation and cellular differentiation.**

Group Leader: Pilar Santisteban

The main objective of our work is the identification of the *cis*-regulatory elements and the transcription factors mediating the hormonal regulation of gene expression. The fact that certain genes are transcribed only in a determined cell type make the thyroid cells an excellent model for both studies. The expression of Tg, TPO and TSH-R genes is restricted to thyroid cells since only in these cells are present three thyroid-specific transcription factors TTF-1, TTF-2 and Pax-8. This transcription factors are member of *homeo*, *fork head* and *paired box* families and are the responsible of thyroid phenotype determination. We have identified the TTF-2 binding site as a hormone response element. How TTF-1 works is much more complex, involving phosphorylation as the main mechanism of regulating its activity. We have also studying the role of PKA, PKC and MAPK in TTF-1 activation/inactivation process. Studying Harvey-ras transformed thyroid cells where TTF-1 is present but inactive we have confirmed the importance of protein phosphorylation in this transcription factor activation. TTF-1 and Pax-8 are involved in thyroid cell proliferation and differentiation, playing an important role in thyroid pathologies. We have described a familiar hypothyroidism due to low expression of the transcription factor TTF-1.

Another important model for study hormonal regulation of gene expression is the regulation of malic enzyme by insulin and thyroid hormones. An element Sp1 like has been identified as mediator of insulin action in the promoter of this gene.

### **Regulation of gene expression in pituitary and neuronal cells by the thyroid hormone/retinoic acid/vitamin D3 subfamily of nuclear receptors.**

Group Leader: Ana Aranda

The nuclear receptors for retinoic acid, vitamin D3 and thyroid hormone, as well as several "orphan" receptors such as PPAR are highly homologous. This homology makes possible that the different receptors can recognize similar DNA elements and regulate common gene networks. We are studying the molecular mechanisms by which those receptors interact among them and with other extracellular signals, growth factors and oncogenes to regulate somatic growth and neuronal cell proliferation and differentiation. Their effect on the expression of pituitary-specific genes (growth hormone, prolactin and the transcription factor GHF-1), "immediate early genes" (*fos*, *jun*, *N10* and *Egr-1*) implicated in proliferation processes, as well as marker genes for neuronal differentiation (neurotrophin receptors, *transin*, *tyrosine hydroxylase*, and *TGF-b*) have been analyzed using pituitary and neuronal cell lines.

### **Signal transduction pathways regulated by growth factors and oncogenes. Biochemical and biological effects.**

Group Leader: Juan Carlos Lacal

Our group is engaged in the characterisation of signal transduction pathways activated during regulation of cell proliferation induced by growth factors and cell transformation induced by oncogenes. Our major interest is dedicated to members of the Ras superfamily of

proteins, including both the Ras and the Rho branches. These two families of proteins belong to the Ras superfamily of monomeric GTPases, proteins with the ability to bind and hydrolyse GTP. Both Ras and Rho proteins are involved in the regulation of proliferation and differentiation processes. Special attention is also dedicated to the regulation of phospholipid metabolism.

Our studies have demonstrated the relevance of the activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase D (PC-PLD) in the induction of cell proliferation by both growth factors and oncogenes. We have also demonstrated the transforming potential of Rho proteins, although this activity is less potent to that of Ras proteins. In addition, oncogenic Rho proteins induce apoptosis under conditions of serum depletion, a process that is not observed in the *ras*-transformed cells. We have further identified the specific activated pathways for the transforming and apoptotic activity of Rho proteins. While PC-PLD is activated in both *ras*- and *rho*-transformed cells, only sphingomyelinase is found activated in the *rho*-transformed cells under conditions of induction of apoptosis. Thus, we suggest that ceramides are the messenger involved, as a progression factor, in the induction of apoptosis. Thus, generation of specific phospholipid-derived metabolites, such as PA, PCho or ceramides, may be critical for the regulation of the biological responses induced by growth factors and oncogenes.

Finally, we are using the knowledge of the activation of specific signalling pathways after transformation by different oncogenes to design strategies to specifically interfere with these pathways in a search for the development of new anti-tumour drugs.

### **Regulation of the $\beta$ -amyloid precursor gene expression.**

Group Leader: Angel Pascual

$\beta$ -amyloid, the major constituent of Alzheimer's plaques is derived from an amyloid precursor protein (APP) which is expressed in several different isoforms spliced from a unique gene that has been mapped to human chromosome 21. Overexpression of APP, as well as a specific increase in mRNA encoding the Kunitz protease inhibitor containing isoforms (770 and 751-mRNA), might contribute to the pathogenesis of this pathology.

We have measured APP-mRNA in four different neural cell lines (PC12, N2A, SH-SY5Y and C6) after different treatments with several hormones and growth factors. Retinoic acid as well as vitamin D3 induce a positive effect on APP gene expression and increase APP-mRNA levels in C6 and SH-SY5Y cells. By contrast, thyroid hormone inhibits these levels in N2A cells when its receptor is overexpressed. In PC12 cells NGF and other growth factors such as b-FGF or EGF induce an increase of APP-mRNA through a ras-dependent mechanism. A similar effect is also observed in the SH-SY5Y cells.

Patterns of the mRNA isoforms have been studied by PCR. Cells of neuronal origin clearly express the three most prevalent isoforms (APP-770, APP-751 and APP-695), whereas the 695 form practically disappears in cells of glial origin. In addition, the existence of two new spliced mRNA isoforms is now under study in PC12 and N2A cells.