

MEMORIA 1996-97

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.: (91)585-4600
Fax: (91)584-4587
internet: <http://www.iib.uam.es>**

INDICE

1. Presentación	5
2. Organigrama del Instituto	7
3. Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer	13
4. Departamento de Bioquímica y Genética de levaduras	39
5. Departamento de Endocrinología Molecular	53
6. Departamento de Enzimología y Patología Molecular	79
7. Departamento de Estructura y Función de Biomoléculas	93
8. Departamento de Regulación de la Expresión Génica	111
9. Departamento de Señalización Celular	137
10. Seminarios celebrados	153
11. Cursos impartidos	163
12. Resumen de Datos Económicos	167
13. Índice alfabético de personas citadas	173
14. Índice alfabético de palabras clave	179
15. Alphabetical listing of Summaries of research topics	185

Presentación

Continuando con la tradición de nuestro Instituto presentamos de nuevo la memoria de actividades, en este caso del bienio 1996-97. Durante este período ha continuado la asociación con el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UAM, teniendo el IIB la consideración de Centro propio del CSIC con personal de otras entidades. El IIB mantiene colaboraciones con dos Unidades Asociadas, el Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid, y el Grupo de Biomembranas del Departamento de Bioquímica de la Universidad del País Vasco. Además, ha sido recientemente aprobada como Unidad Asociada, la del Grupo del Nitrógeno de Levadura de la Universidad de La Laguna.

La actividad científica del Instituto es bastante considerable, en relación con su tamaño y recursos. En un reciente análisis bibliométrico, hemos constatado que en el periodo 1992-96, el número de publicaciones del IIB listadas en el SCI es de 366. En 1997 se publicaron 98 artículos de revistas y 13 capítulos de libros. En estos momentos el presupuesto anual total, incluido personal, es de unos 800 millones de pesetas, de los cuales aproximadamente 40 millones constituyen el presupuesto ordinario y 350 millones proceden de Proyectos de Investigación. El Instituto tiene planteados graves problemas de personal y de espacio. El tamaño de los laboratorios es pequeño, haciendo que el trabajo de los grupos se desarrolle en condiciones de estrechez, coartando las posibilidades de crecimiento. La falta de espacio no permite la incorporación de grupos externos que puedan ser beneficiosos al Instituto. Este problema puede quedar parcialmente solucionado, al menos temporalmente, con la apertura del edificio de ampliación, cuya edificación comenzó en el verano de 1996, terminándose en diciembre de 1997. La ampliación del Instituto supone la disponibilidad de 15 nuevos laboratorios, con un 50% de incremento de la superficie total y un 70% de incremento de la superficie de laboratorios. Naturalmente, la ocupación de estos nuevos espacios plantea también problemas de financiación de infraestructura científica, al mismo tiempo que incrementa las ya acusadas deficiencias de personal de apoyo a la investigación. Calculamos que el nuevo edificio puede albergar un mínimo de 75 investigadores (PIP y PINP), lo que requeriría un aumento del personal de apoyo de entre 10 y 20 personas. Esperemos que el crecimiento cuantitativo del personal científico se vea acompañado de un aumento proporcional de personal de apoyo.

La situación geográfica del IIB condiciona parte de su actividad. Por un lado su ubicación en el campus de la Facultad de Medicina de la UAM, y su relación con el Departamento de Bioquímica permite la colaboración en las tareas docentes. El Instituto participa activamente, no sólo en los cursos de Doctorado, sino en programas especiales, como el de Iniciación a la Investigación y en la Licenciatura de Bioquímica. Durante el verano son muchos los laboratorios que albergan durante dos meses a estudiantes que han finalizado el primer curso de Medicina. Estos alumnos tienen una primera exposición al trabajo diario de un laboratorio de investigación, lo que indudablemente contribuye a su formación. Por otro lado, el curso 97-98 es el primero en el que los alumnos de la Licenciatura de Bioquímica se integran en el laboratorio como parte de la enseñanza de la misma.

Además, la cercanía del Instituto a la Ciudad Sanitaria La Paz, facilita el desarrollo de proyectos en colaboración con grupos hospitalarios. Numerosos grupos del Centro mantienen colaboraciones estables con grupos de La Paz, además de con otras instituciones sanitarias, como el Carlos III y la Clínica Puerta de Hierro. Es deseable que este tipo de interacciones continúen y se potencien en el futuro.

Finalmente, no se puede ignorar el problema de los doctores contratados, cuya situación de incertidumbre laboral ante el futuro, y la falta de alternativas puede terminar con el entusiasmo y dedicación con que actualmente se enfrentan a su trabajo. Es necesario que urgentemente se arbitren medidas para encontrar soluciones satisfactorias a este colectivo.

Juan Bernal Carrasco
Director en funciones

Organigrama del Instituto

Director: Juan Bernal (desde Junio 1997)
Ana Aranda (hasta Junio 1997)

Vicedirector: Miguel Quintanilla (desde Junio 1997)
Leandro Sastre (hasta Junio 1997)

Gerente: Rafael Alguacil

Departamentos de Investigación:

1. Biología Molecular y Celular del Cáncer

Jefe de Departamento:
Rosario Perona

Investigadores:
Amparo Cano
Juan Carlos Lacal
Angel Pestaña
Miguel Quintanilla
Antonio Villalobo

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

2. Bioquímica y genética de levaduras

Jefe de Departamento:
Pilar Eraso

Investigadores:
Carlos Gancedo
Rosario Lagunas
M^a Jesús Mazón
Francisco Portillo
Juana M^a Sempere

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

3. Endocrinología Molecular

Jefe de Departamento:
Pilar Santisteban

Investigadores:
Juan Bernal
Francisco Escobar
Gabriela Morreale

Alberto Muñoz
M^a Jesús Obregón

Personal de Apoyo a la Investigación:

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

4. Enzimología y Patología Molecular

Jefe de Departamento:

Antonio Sillero

Investigadores:

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

Personal de Apoyo a la Investigación:

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

5. Estructura y Función de Biomoléculas

Jefe de Departamento:

M^a Angeles Pajares

Investigadores:

Susana Alemany
Sebastián Cerdán
Margarita Fernández
José G. Castaño
José María Mato (hasta septiembre 1997)
Francisco Vara

Personal de Apoyo a la Investigación:

Carmen Domínguez
Francisco Jesús Garrido
Joaquín Oliva

6. Regulación de la expresión génica

Jefe de Departamento:

Leandro Sastre

Investigadores:

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

Personal de Apoyo a la Investigación:

Jorge Martínez
Pilar Ochoa
Ana M^a Seguido
Aida Villa

7. Señalización Celular

Jefe de Departamento:

Isabel Varela

Investigadores:

Antonio Cuadrado
Juan Emilio Felú
Jorge Martín
Jaime Renart
M^a Angeles Rodríguez Peña

Personal de Apoyo a la Investigación:

M^a Carmen Moratilla

Servicios de Gestión y Administración

Responsable:

Rafael Alguacil

Administración:

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

Almacén:

Mariano Garrido
Javier Laforga (1996)
José Vicente Ruiz-Peinado (1997)

Biblioteca:

M^a Paz Langa

Correspondencia:

Manuel Gallardo

Secretaría de Dirección:
Renée Clarys (1996)
Begoña Medina (1997)

Recepción y telefonía:
Juana de la Rosa
Gabriel Barón

Servicios Técnicos:

Animalario:
Fernando Nuñez
Pablo Señor

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

Dibujo y Delineación:
Javier Pérez

Fotografía:
Antonio Fernández
Ricardo Uña

Informática:
Javier Merino

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

Mantenimiento:
Roberto López
Angel García
Ramón Navares
Rafael Vara

Radioprotección:
M^a Teresa Macías
Raquel Pina

Secuenciación:
Gemma Rodríguez-Tarduchy

Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer

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

Investigador principal:	Cano, Amparo, Profesora Titular UAM
Investigadores asociados:	Quintanilla, Miguel, IIB
Becarios Predoctorales:	Lozano, Encarnación (hasta 1996) Rodrigo, Isabel Espada, Jesús Santana, Mónica (hasta 1996)
Personal de apoyo:	Montes, Amalia
Colaboraciones:	Gamallo, Carlos, Palacios, José (Dpto. Anatomía Patológica. Hospital La Paz, Madrid) Fabra, Angles (Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynals, Barcelona) Ramón y Cajal, Santiago (Dpto. Anatomía Patológica. Hospital Puerta de Hierro, Madrid) Larcher, Fernando (CIEMAT, Madrid) Nieto, Angela (Instituto Cajal. CSIC. Madrid) Balmain, Allan (Onyx Pharmaceutical. Richmond. California. USA) Behrens, Jurgen, Birchmeier, Walter (Max-Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin)

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

(I. Rodrigo, M. Santana, A. Montes, J. Behrens, W. Birchmeier, A. Cano)

Tomando como base nuestros estudios previos, se ha continuado investigando la regulación de la expresión de los promotores de CD-E y CD-P en una colección de líneas de queratinocitos epidérmicos de diferentes estadios de progresión. Los estudios sobre el promotor de CD-P han mostrado la participación de factores Sp1 en el reconocimiento de la región GC del promotor basal, y la regulación de la actividad transcripcional a través de un enhancer localizado en el primer intrón del gen, con un papel preponderante de un sitio AP-1. Los estudios sobre el promotor de CD-E han mostrado la participación de factores Sp1 y AP2 en el reconocimiento de la región GC proximal del promotor basal y la existencia de modificaciones en AP-2, o alteraciones en su interacción con cofactores, en células deficientes en la expresión de CD-E. La expresión de CD-E, está regulada de forma compleja con la participación positiva de elementos del promotor basal (región GC y caja CCAAT) y negativa a través del elemento palindrómico E-pal (-76 a -88) y de un sitio Ets (-95). Los estudios de interacción *in vivo* han puesto de manifiesto la existencia de una conformación "abierta" del promotor en células CD-E (+) con múltiples sitios de interacción en las regiones reguladoras caracterizadas *in vitro*, mientras que en células CD-E (-) la interacción con factores de transcripción se limita al elemento E-pal y al sitio Ets. Por otra parte, los análisis de comparación de los promotores de CD-E y de CD-P han mostrado la existencia de elementos y factores comunes en la regulación de la actividad basal de ambos genes: región GC (Sp1) y caja CCAAT (CP1), y de factores adicionales en el promotor de CD-E: región GC (AP2), caja CCAAT (CP2, C/EBP), lo que junto a los elementos específicos (E-pal, Ets) ponen de manifiesto la mayor complejidad de la regulación de la expresión de CD-E.

Dentro de esta línea de investigación, y en colaboración con la Dra. A. Nieto hemos observado que la sobreexpresión de factores de transcripción de la familia *slug/snail* (con potencial reconocimiento del elemento E-pal) ejerce un efecto estimulador de la expresión de CD-E. De igual forma, los estudios realizados en colaboración con el Dr. S. Ramón y Cajal han

mostrado que la expresión del gen E1A de adenovirus induce la expresión de CD-E en líneas indiferenciadas de carcinomas fusiformes, en paralelo a la inducción de radio- y quimioresistencia y a una fuerte represión de la tumorigenicidad.

Modulación de la actividad funcional de CDE en la progresión tumoral. Análisis de los complejos CD-E/cateninas e influencia de H-ras.

(E. Lozano, J. Espada, A. Montes, 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: α -, β -, γ -catenina (esta última idéntica a plakoglobina), existiendo dos tipos de complejos donde β -catenina y plakoglobina se asocian de forma independiente a cadherinas. Adicionalmente, β -catenina y plakoglobina citoplásmicas participan en vías de señalización a través de su interacción con factores de transcripción LEF-1/TCF, siendo reguladas en esta función por APC. Nuestros estudios en la carcinogénesis de piel de ratón se centran en el análisis de los complejos CD-E/cateninas en las diferentes líneas celulares de queratinocitos y su posible modulación por H-ras. El análisis de los complejos en líneas de morfología epitelial ha mostrado que los dos tipos de complejos contribuyen al mantenimiento de las interacciones célula-célula estables en queratinocitos epidérmicos. Por otra parte, el estudio detallado de un sistema celular constituido por una línea fusiforme (deficiente en CD-E y plakoglobina) y de una serie de clones que expresan plakoglobina y/o CD-E de forma estable ha permitido determinar que ambas moléculas contribuyen a su estabilización mutua y ejercen un moderado efecto represor de la tumorigenicidad. No obstante, los clones CD-E+/plakoglobina+ mantienen un fenotipo fibroblastoide (*in vitro* e *in vivo*) similar al de las células parentales.

La influencia del oncogén H-ras sobre los complejos CD-E/cateninas (expresión de los componentes y/o funcionalidad) se está analizando en líneas de queratinocitos con diferentes niveles de H-ras oncogénico u obtenidas por transfección estable de queratinocitos inmortalizados y derivados de papilomas con vectores retrovirales de expresión de H-ras oncogénico. La expresión de H-ras induce la disminución de la expresión de CD-E y la redistribución de los componentes de los complejos, que lleva a una deslocalización de β -catenina y plakoglobina de la fracción asociada al citoesqueleto a la fracción soluble. La relación entre la solubilización de β -catenina/plakoglobina, su interacción con APC y su capacidad de señalización por interacción con factores de transcripción está siendo analizada actualmente.

Papel de la CD-E en la invasión y la metástasis y su relación con proteasas de matriz extracelular.

(I. Rodrigo, E. Lozano, C. Gamallo, M. Quintanilla, A. Fabra, A. Cano)

Estos estudios se basan en el sistema celular constituido por una línea celular derivada de un carcinoma epidermoide, HaCa4 (CD-E-), y una serie de clones obtenidos tras la transfección con el cDNA de CD-E (E62, E24) o la transfección de cDNA antisentido de CD-E en la línea E24 (CD-E+). La ausencia de expresión de CD-E induce un fenotipo invasivo *in vitro* (migración en geles de colágeno) y metastásico *in vivo* (inducción de metástasis pulmonares espontáneas en ratones inmunodeprimidos), directamente asociado a la expresión/actividad de la metaloproteínasa MMP-9. El análisis de otras MMPs y sus inhibidores, así como del activador de plasminógeno uPA, no ha mostrado alteraciones en relación con la expresión de CD-E. Estos resultados indican que el papel anti-invasivo de CD-E en este sistema está mediado a través de la represión de la expresión/actividad de MMP-9. No obstante, la expresión de CD-E, por sí sola, no es suficiente para revertir el fenotipo metastásico de la línea HaCa4, como ocurre en el clon E62. El análisis de los complejos CD-E/cateninas presentes en la línea E62 sugiere la existencia de mecanismos de downregulación transitoria *in vivo* de la expresión/función de los mismos, lo que puede estar relacionado con los altos niveles de H-ras oncogénico presentes en E62. La relación entre expresión de CD-E, H-ras y el fenotipo metastásico también se ha analizando en relación con la angiogénesis, donde los estudios realizados en colaboración con el Dr. F.

Larcher han mostrado la sobreexpresión del factor angiogénico VEGF en estrecha relación con los niveles de H-ras oncogénico.

Por otra parte, el papel anti-invasivo específico de CD-E se ha podido demostrar *in vivo* mediante el análisis de tumores inducidos por carcinogénesis química en ratones nulos para p53 (en colaboración con el Dr. A. Balmain) que muestran la pérdida específica de CD-E en las áreas de invasión local de papilomas en progresión a carcinomas, mientras que las células invasivas mantienen la expresión de CD-P y otras moléculas de adhesión como la integrina $\alpha 6\beta 4$. Estos estudios sugieren, por otra parte, que la expresión de p53 puede estar implicada de forma directa o indirecta en la expresión/función de CDE.

Dentro de esta línea de investigación, los estudios realizados en colaboración con el Dr. S. Ramón y Cajal también han puesto de manifiesto que la expresión del gen E1A suprime el fenotipo tumorigénico y metastásico de líneas de carcinomas indiferenciados. Actualmente, estamos analizando la relación de estos efectos con la expresión de CD-E.

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

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

Nuestros estudios previos sobre la expresión de CD-E y CD-P en una amplia colección de carcinomas de mama habían mostrado la pérdida de expresión de CD-E en relación con el tipo histológico y grado de diferenciación y la expresión anómala de CD-P en un subtipo de carcinomas ductales poco diferenciados. Por otra parte, el estudio de la expresión de CD-E junto 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 y alteraciones en el receptor de progesterona, y la ausencia de correlación con la sobreexpresión de c-erbB2. Por otra parte, el análisis de la expresión de cateninas en esta misma serie de tumores ha mostrado la existencia de alteraciones frecuentes en la expresión/localización de plakoglobina.

En esta misma línea, y más recientemente, se ha iniciado el estudio de la expresión de los complejos CD-E/cateninas en tumores de ovario y endometrio, donde se ha observado alteraciones frecuentes en la localización de β -catenina. Actualmente se está procediendo al análisis molecular de β -catenina y plakoglobina (mediante RT-PCR) en tumores de mama y endometrio con el fin de caracterizar la presencia de posibles mutaciones. Asimismo, se analizará la expresión de APC en relación con los complejos CD-E/cateninas y otros factores clínico-patológicos. En conjunto, estos estudios nos pueden permitir delimitar la utilidad pronóstica del sistema de adhesión mediado por CD-E o CD-P en estos tipos de carcinomas.

Papel del gen *hairless* en el desarrollo embrionario y la organización tisular.

(B. Cachón, T. Schimmang, I. SanJosé, A. Cano, F. Giráldez, A. Represa)
(desarrollado durante la estancia sabática de A. Cano en el Instituto de Genética y Biología Molecular, Fac. Medicina, U. de Valladolid, en 1996).

La ausencia de expresión del gen *hairless* (*hr*) da lugar a un fenotipo caracterizado por la ausencia de pelo en los ratones afectados, existiendo distintos fenotipos de severidad en diferentes cepas de ratones mutantes espontáneos. Entre ellos, el fenotipo rhino es el más acusado, donde la ausencia de pelo se acompaña de otras alteraciones cutáneas y defectos en el sistema inmunológico y sensorial. Los estudios realizados por la Dra. B. Cachón han permitido caracterizar las mutaciones en el gen *hr* presentes en el fenotipo rhino, así como la expresión del gen en el desarrollo embrionario en diferentes tejidos además de la epidermis. De acuerdo con estos resultados, los estudios realizados en diferentes tejidos de ratones rhino adultos han mostrado la existencia de alteraciones estructurales en una gran variedad de tejidos, como epidermis, intestino, colon, retina, oído interno, glándula mamaria y tiroideas. El análisis de la expresión de CD-E y otros marcadores de diferenciación epitelial sugiere que el gen *hr* está implicado en la regulación de la expresión/función de CD-E en diferentes tejidos epiteliales.

Publicaciones

- Cano A, Gamallo C, Kemp CJ, Benito N, Palacios J, Quintanilla M and Balmain A (1996). Altered expression of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and $\alpha 6\beta 4$ in tumors induced in p53 knock out mice. *Int. J. Cancer* 65, 254-262
- Caulín C, López-Barcons Ll, González-Garrigues M, Navarro P, Lozano E, Rodrigo I, Gamallo C, Cano A, Fabra A, and Quintanilla M (1996). Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced levels of Ha-ras oncogene products. *Mol. Carcinog.* 15, 104-114.
- Gamallo C, Palacios J, Benito N, Limeres MA, Pizarro A, Suárez A, Pastrana F, Cano A, and Calero F (1996). Expression of E-cadherin in 230 infiltrating ductal breast carcinoma: relationship to clinicopathological features. *Int. J. Oncol.* 9, 1207-1212.
- Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Lleonart M, Martin P, Anaya A, and Ramón y Cajal S (1996). Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 13, 1083-1092.
- Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti C, and Jorcano JL (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res.* 56, 5391-5396.
- Faraldo MLM, Rodrigo I, Behrens J, Birchmeier W, and Cano A (1997). Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47.
- Sánchez-Prieto R, Martin Duque P, Lleonart M, Romero J, Quintanilla M, Cano A, and Ramón y Cajal S (1997). El gen E1A de adenovirus: actividad terapéutica en patología tumoral. *Oncología* 20, 723-733.

Tesis doctorales

Encarnación Lozano Pérez

“Estudio de los complejos adherentes cadherina E/cateninas en queratinocitos epidérmicos murinos normales y transformados. Implicación de la plakoglobina en el fenotipo y tumorigenicidad”. Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996.
Directora: Amparo Cano. Calificación: Apto “cum laude”.

Palabras clave

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

Rutas de Transmision de Señales Reguladas por Factores de Crecimiento y Oncogenes.

Investigador Principal:	Lacal, Juan Carlos, Investigador Científico
Becarios Postdoctorales:	Esteve, Pilar (hasta diciembre 1996) del Peso, Luis (hasta diciembre 1996) Wieprecht, Marcus (enero-mayo 1996) Embade, Nieves (desde noviembre 1997) Montaner, Silvia (desde noviembre 1997)
Becarios predoctorales:	Embade, Nieves (hasta octubre, 1997) Montaner, Silvia (hasta octubre, 1997) Hernández, Rubén Lucas, Luisa Suárez, Concepción (hasta septiembre 1997) Fernández, Félix Rodríguez, Pilar (desde enero 1997) Gallego, Juan Carlos (desde septiembre 1997)
Personal de Apoyo:	Ramos, M ^a Angeles
Colaboraciones:	Perona, Rosario, IIB Arends, Mark, Univ. Edimburgo, UK Bravo, Rodrigo, Bristol-Myers Squibb, USA Gutkind, Silvio, LCDO, NIDR, NIH, USA Miki, Toru, LCMB, NCI, NIH, USA León, Javier, Univ. Cantabria, Santander Espinosa, Antonio, Univ. Granada Di Donato, Armando, Ist. G. Gaslini, Genova, Italia

Participacion de Proteinas Rho en Transformacion y Apoptosis

(P. Esteve, N. Embade, C. Suárez, J.C. Gallego)

Nuestro grupo ha demostrado que la expresión de proteínas Rho influye substancialmente la decisión de células para activar la ruta de la proliferación o de la apoptosis. Además, la respuesta al tratamiento genotóxico por drogas utilizadas en terapia antitumoral como el cisplatino, está alterada en células expresando niveles elevados de proteínas Rho. La decisión de conservar o eliminar células dañadas es una parte esencial de la carcinogénesis, y constituye un elemento fundamental en la determinación de la resistencia o sensibilidad de los tumores a la terapia. Por tanto, el trabajo de nuestro grupo consiste en desarrollar un mejor conocimiento de la actividad biológica de las proteínas de la familia Rho, en un intento de comprender en mayor profundidad el proceso de tumorigénesis y la apoptosis.

Transfectando y sobreexpresando tanto la versión normal como la mutada de genes *rho* en fibroblastos de ratón NIH 3T3, hemos demostrado que inducen características morfológicas de transformación en placas de cultivo. Asimismo, estos genes tienen la capacidad de formar colonias en medio semisólido indicando su independencia de anclaje a un soporte, típico de las células transformadas, y por último, dan tumores al ser inoculadas en ratones desnudos. También hemos demostrado que las proteínas Rho median en el proceso de muerte celular programada, puesto que células sobreexpresando genes *rho* entran en apoptosis en condiciones de bajo suero. Hemos comprobado que la retirada de suero induce la producción de ceramidas, como resultado de la activación de una esfingomielinasa endógena. Las ceramidas son metabolitos lipídicos que actúan como segundos mensajeros en la señalización de la muerte celular programada. Las células sobreexpresando *rho* entran en apoptosis incluso en presencia de suero cuando se les añade ceramidas, y este proceso se acelera cuando se tratan las células con esfingomielinasa. Así, las proteínas Rho actuarían como una señal de iniciación que es necesaria pero no suficiente para la inducción de apoptosis en células NIH 3T3. Estos resultados

nos ha llevado a proponer que en este sistema la inducción de apoptosis requiere dos señales complementarias: una de iniciación generada incluso en presencia de suero y que hace a las células más sensibles a la segunda señal. Esta segunda señal, en este caso las ceramidas, sería de progresión hacia la apoptosis y se provocaría por privación de suero. Por último, estudios recientes de nuestro grupo demuestran la inducción de apoptosis por varios genes humanos de la familia *rho* en diversos sistemas celulares, de forma p53 independiente, pero sensibles a Bcl-2. Actualmente, estamos estudiando las rutas de señalización intracelular utilizadas por proteínas Rho para la inducción de la apoptosis en diferentes sistemas celulares.

Regulación de la Transcripción Genica por Proteínas Rho.

(S. Montaner, R. Perona, L. Saniger)

La gran cantidad de procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas Rho hacía pensar que debían estar regulando rutas de señalización que tuviesen efecto directo en la transcripción de genes en el núcleo. En este sentido se ha demostrado que Rho, Rac y Cdc42 pueden inducir activación de SRE dependiente de SRF, y que Rho media esta activación en respuesta a varios estímulos incluyendo suero y LPA. A causa de que la activación de TCF y SRF inducen sinérgicamente la transcripción de *c-fos* y a que Ras activa TCF vía Raf-MAPK, se piensa que las vías de Ras y Rho convergen en el núcleo para aumentar esta transcripción.

Recientemente nuestro grupo ha descrito cómo las proteínas Rho A, B y C, así como Cdc42 y Rac1 inducen actividad transcripcional del factor nuclear kB (NF-kB) por un mecanismo que involucra la fosforilación de IκBα y la translocación de los dímeros p50/p50 y p50/p65 al núcleo, pero que es independiente de Ras y de Raf. También hemos mostrado como la activación de NF-kB por TNFα depende de Cdc42 y de RhoA pero no de Rac1, a causa de que esta actividad se inhibe drásticamente por sus respectivos mutantes dominantes negativos. En contraste, la activación de NF-kB por luz ultravioleta no se afecta por los dominantes negativos de Rho, Cdc42 o Rac1. Nuestro grupo investiga actualmente los mecanismos moleculares de activación de diversos factores de transcripción, entre ellos NF-kB y SRF por esta familia de GTPasas.

Papel de las Proteínas Rho en Metástasis

(L. del Peso, R. Hernández, N. Embade)

La metástasis incluye una serie de eventos incluyendo la separación de los tejidos originales, la degradación de la matriz y la adhesión y migración a través de las capas de células (transcitos). Se piensa que el sistema de cadherinas/cateninas y las metaloproteinasas de la matriz están involucrados en los primeros dos pasos, mientras que la familia de proteínas Rho podría estar mediando en la última. También se ha involucrado a las proteínas Rho en la adhesión de leucocitos activados con quimioatrayentes a través de las integrinas y se ha visto como al menos parte de la señalización intracelular del receptor del HGF está mediado por las proteínas Rho. La glicoproteína CD44 que media en adhesión celular, interacciona en el citoplasma con un complejo proteico compuesto por Erzina, Radixina y Moesina (ERM). La translocación de este complejo del citoplasma a la membrana podría estar controlada por Rho. Nuestro laboratorio ha demostrado que las proteínas oncogénicas Rho A y Rac 1 confieren propiedades metastásicas a células NIH3T3 de ratón cuando éstas se inyectan en animales tanto en sistemas de estudio de metástasis inducida como espontánea. Aunque todavía no hemos investigado el mecanismo específico por el que se regula este proceso, estos resultados suponen la primera evidencia de un papel de las proteínas Rho en la regulación de metástasis *in vivo*.

Identificación de Nuevas Dianas para el Diseño de Fármacos en la Terapia Antitumoral

(R. Hernández, L. del Peso, L. Lucas, P. Rodríguez, F. Fernández, M. Wieprecht)

La aparición de células tumorales en un organismo se produce como consecuencia de la ruptura de la regulación normal de la cascada de señales intracelulares asociada a la activación

celular por factores de crecimiento y hormonas. La identificación de numerosos oncogenes y genes supresores como componentes estructurales de la cascada de la transmisión de señales, incluyendo factores de crecimiento, receptores para los mismos, proteínas G, quinasas y fosfolipasas intracelulares, factores de transcripción y proteínas reguladoras de factores de transcripción, han permitido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la proliferación celular. Asimismo, ha permitido identificar los componentes estructurales esenciales en este proceso que aunque no han sido descritos todavía como oncogenes o genes supresores, son parte esencial de la cascada. Entre estos, destacan algunas fosfolipasas y miembros de la cascada de Serina/Treonina quinasas activadas durante el crecimiento celular. Nuestro laboratorio investiga el efecto que la transformación mediada por oncogenes de la familia *ras* tiene sobre la generación de segundos mensajeros derivados de fosfolípidos.

Hemos encontrado que el metabolismo de algunos lípidos está alterado de forma importante, y que los mensajeros derivados como consecuencia de estas alteraciones, activan la ruta de quinasas intracelulares de forma constitutiva. En trabajos recientes hemos identificado el enzima responsable de estas alteraciones como una PLD, con la generación de ácido fosfatídico (PA) y colina. Estos metabolitos son convertidos posteriormente en dicilglicerol (DAG) y fosforilcolina (*PCho*) por los enzimas PA-hidrolasa (PAH) y colina-quinasa (ChoK) respectivamente. Estos últimos metabolitos, DAG y *PCho*, juegan un papel relevante en la regulación de la proliferación celular. Mientras que el DAG es un activador natural de algunos miembros de la familia de proteínas quinasas C (PKC), la ausencia de producción de *PCho* al inhibir específicamente ChoK, reduce drásticamente la capacidad de las células para proliferar en respuesta a factores de crecimiento.

Gracias a la disponibilidad de inhibidores de la PAH (propranolol) y ChoK (HC-3), hemos demostrado que la generación de DAG y *PCho* tanto en células normales estimuladas por suero como en células transformadas por oncogenes *ras*, son consecuencia de la activación de una PLD. Asimismo, los niveles de colina y *PCho* aparecen elevados de forma constitutiva, pero la adición de inhibidores de la ChoK, reduce los niveles de *PCho* sin afectar los de colina.

En experimentos realizados con células normales estimuladas mitogénicamente con diferentes factores de crecimiento, hemos observado que la inhibición de la ChoK, y por tanto el bloqueo de la producción de *PCho*, inhibe en más de un 90% la estimulación de la síntesis de DNA. Este efecto no es tóxico, puesto que en idénticas condiciones, la estimulación mitogénica del suero no se afecta, la adición de insulina revierte el efecto inhibitor del HC-3 sin reponer los niveles de *PCho*, y la inhibición de la ChoK a las 6-8 horas de la estimulación no inhibe la síntesis de DNA estimulada por factores de crecimiento. También hemos observado que la adición del inhibidor de la ChoK (HC-3) no tiene ningún efecto sobre la interacción de factores de crecimiento con su receptor o la actividad de Tyr-quinasa del receptor activado, ni tampoco sobre la activación de la PI 3 quinasa, como marcador enzimático, indicando que no interfiere con la ruta de señales intracelulares como consecuencia del bloqueo de la activación del receptor por el factor. Por último, en experimentos realizados *in vitro*, la adición de HC-3 a concentraciones de hasta 50 veces superiores a la IC₅₀ sobre la ChoK, no tiene actividad inhibitora sobre fosfolipasas ni sobre diferentes isoenzimas de PKC.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que los enzimas PLD y ChoK, juegan un papel esencial en la transmisión de la señal mitogénica inducida por factores de crecimiento y oncogenes. Recientemente hemos demostrado que la ChoK puede ser utilizada como diana para el diseño de nuevos antitumorales. La inhibición de ChoK mediante compuestos de nueva síntesis desarrollados en nuestro laboratorio presentan actividad antiproliferativa frente a células transformadas por diversos oncogenes y líneas tumorales humanas.

Publicaciones

del Peso L., Hernández R., Esteve P. and Lacal J.C. (1996). Activation of phospholipase D by Ras proteins is independent of protein kinase C. *J. Cell Biochem.* 61:599-608.

del Peso L., Montaner S., Jiménez B., Carnero A., Esteve P., Embade N., Ramos A., Lacal J.C. (1996). La producción de *PCho* es esencial en la regulación de señales

mitogénicas inducida por factores de crecimiento. Resúmenes del IV Simposio sobre Oncogenes. Bases moleculares del cáncer y sus aplicaciones clínicas. E. Blasco, J.C. Lacal y R. Perona (edts.).

Carnero A., Embade N. y Lacal J.C. (1997). Bases Genéticas y Moleculares. "Hematología Oncológica Pediátrica". L. Madero y A. Muñoz (edts.), ediciones Ergón S.A., Madrid.

del Peso L., Esteve P. and Lacal J.C. (1997). Activation of phospholipase D by growth factors and oncogenes in murine fibroblasts follow alternative but cross-talking pathways. *Biochem. J.* 322:519-528.

Perona R., Montaner S., Saniger L., Sánchez-Pérez I., Bravo R. and Lacal J.C. (1997). Activation of the nuclear factor kB by Rho, CDC42 and Rac. *Genes & Development* 11:463-475.

Lacal J.C. (1997). Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependnet signaling. *FEBS Lett.* 410, 73-77.

Coso O.A., Montaner S., Fromm C., Lacal J.C., Teramoto H., Prywes R. and Gutkind S. (1997). Signaling from G protein-coupled receptors to the *c-jun* promoter involves the MEF2 transcription factor: evidence for a novel JNK-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 20691-20697 (1997).

Hernández-Alcoceba R., Saniger L., Campos J., Núñez M.C., Khaless F., Gallo M.A., Espinosa A., and Lacal J.C. (1997). Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* 15, 2289-2301.

Di Donato A, Lacal JC, Di Duca M, Giampuzzi M, Ghiggeri G. and Gusmano R. (1997). Micro-injection of recombinant lysyl-oxidase into *Xenopus laevis* oocytes inhibits germinal vesicle breakdown induced by activated p21-Ha-ras. *FEBS Lett.* 419, 63-68

del Peso L., Hernández-Alcoceba R., Embade N., Carnero A., Esteve P., Paje C., and Lacal J.C. (1997). Rho proteins induce metastasic properties *in vivo*. *Oncogene* 15, 3047-3057.

Tesis Doctorales

Luis del Peso Ovalle

“Papel de ls proteínas Ras en la regulación de la fosfolipasa D”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Apto “cum laude”.

Nieves Embade Urrutia

“Las proteínas Rho inducen propiedades metastásicas *in vivo*”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Apto “cum laude”.

Silvia Montaner Salas

“Activación del factor NF-kB por las proteínas Rho, Rac y CDC42Hs”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Apto “cum laude”.

Palabras Clave

GTPasas, Ras, Rho, Transmisión de señales, Factores de crecimiento, Fosfolípidos, Transformación, Apoptosis, Metástasis, Antitumorales

Mecanismos de respuesta a daño celular inducido por luz ultravioleta y cisplatino.

Investigador principal:	Perona, Rosario, Colaborador Científico.
Becarios predoctorales:	Gómez, Lourdes Guerra, Javier Murguía, José Ramón (Hasta Julio 1997) Sánchez, Isabel Saniger, Luisa
Personal de apoyo:	Cañavete, Mercedes (desde Febrero 1997)
Colaboraciones:	Lacal, Juan Carlos, IIB Bonilla, Felix, Clínica Puerta de Hierro. Martinez Piñeiro, Luis, Hospital La Paz. Keyse, Stephen, ICRF. Dundee.U.K.

La inducción de daño en el DNA provoca en la célula una serie de respuestas que por una parte inducen una parada en el ciclo celular y por otra activan los mecanismos de reparación del DNA. Finalmente si el daño no se puede reparar se desencadena el proceso de apoptosis. En nuestro grupo estamos interesados en el estudio de las respuestas que facilitan en la célula el proceso de apoptosis en respuesta a la luz ultravioleta y el agente quimioterapéutico cisplatino. La exposición de la células a los isómeros del dimetildicloroplatino: transplatino (inactivo) y cisplatino (activo) induce la activación de la quinasa del factor de transcripción c-jun. La activación inducida por cisplatino es sostenida en el tiempo y correlaciona con la apoptosis causada por la droga. Esta activación se puede modular positivamente por inhibidores de tirosina fosfatasa, produciéndose una mayor toxicidad por ambos compuestos. De acuerdo con estos resultados la fosfatasa MKP-1, que es capaz de defosforilar tanto MAP quinasa como Jun quinasa se induce preferencialmente con transplatino y no por cisplatino, sugiriendo su implicación en la cinética diferencial de junquinasa en respuesta a ambas drogas. Estos resultados apuntan hacia estas enzimas como posibles dianas en la mejora de los protocolos de cisplatino.

Por otra parte hemos determinado que la cascada de MEKK1-SEK1 esta implicada en la activación de junquinasa en respuesta a cisplatino. La sobreexpresión de dominantes negativos de esta cascada de quinasa bloquea la apoptosis inducida por este compuesto en células humanas. Actualmente estamos estudiando cual es el papel de esta cascada de quinasa y la fosfatasa CL100 en el desarrollo de resistencia a cisplatino, en líneas de carcinoma de ovario.

Hemos generado una librería normalizada de elementos supresores génicos humanos con el fin de identificar genes de sensibilidad a cisplatino. Esta librería se ha utilizado para aislar líneas celulares resistentes a cisplatino y actualmente se están analizando las secuencias obtenidas y su posible papel en la apoptosis inducida por esta droga. Los clones obtenidos se utilizarán para obtener células de médula ósea resistentes a cisplatino y ensayar su viabilidad in vivo.

Detección de PSA en sangre mediante RT-PCR como medida de micrometastasis de cancer de prostata. Posible papel como factor pronóstico.

En nuestro laboratorio estamos utilizando la técnica de RT-PCR para detectar en células metastásicas circulantes prostáticas el mRNA de antígeno prostático (PSA). Para ello se ha utilizado sangre proveniente de pacientes sometidos a prostatectomía radical en los cuales se trata de determinar la subpoblación de pacientes con cancer prostático localizado que tengan células tumorales circulantes en el momento del diagnóstico y determinar que maniobras diagnósticas y terapéuticas desencadenan una suelta de células tumorales en el torrente circulatorio.

Publicaciones

Cosgaya, J.M., García-Villalba, P., Perona, R. and Aranda, A. (1996). Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation,

differentiation and gene expression. *J. Neurochem.* 66,89-97.

Cosgaya, J.M., Perona, R., and Aranda, A. (1997) Retinoic acid induces secretion of transforming growth factor by PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* 14, 579-587

García-Sález, A., Perona R. and Sastre L. (1997) Polymorphism and structure of the gene coding for the $\alpha 1$ subunit of the *Artemia franciscana* Na/K ATPase. *Biochem. J.* 321, 509-518

Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Perez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C. (1997). RHO, CDC42, Rac proteins activate the nuclear factor κ B by a ras and raf independent pathway. *Genes & Development* 11, 463-475

Palabras clave

Oncogenes, proliferación, estrés, apoptosis, cisplatino, luz UV, PSA, cáncer de próstata.

Modelos de progresión tumoral en neoplasias neurogénicas.

Investigador Principal:	Pestaña, Angel, Investigador Científico
Investigadores Contratados:	Bello, M ^a José Rey, Juan A. Saez-Castresana, Javier (hasta septiembre 1997)
Becarios predoctorales:	Leone, Paola (hasta enero 1997) Nebreda, Paloma Mendiola, Marta Alonso, Javier
Colaboraciones:	Campos, José M ^a . de, Kusak, M ^a .Elena (S. Neurocirugía, Hospital del Río Hortega, Valladolid) Vaquero, Jesús (S. Neurocirugía, Clínica Puerta de Hierro) Sarasa, Jose L. (S. Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz) García-Miguel, Purificación., Queizán, Antonio, Hernandez Moneo, Jose.L., Gamallo, A. (Oncología Pediátrica, Cirugía Infantil, Neurocirugía y Anatomía Patológica. Hospital La Paz)

Los tumores neurogénicos incluyen dos tipos histológicos: gliomas y meningiomas, que proporcionan sendos modelos de progresión tumoral. Los gliomas de la serie astrocítica se presentan como formas de grado II de malignidad, que pueden evolucionar hacia astrocitomas anaplásicos de grado III y glioblastoma multiforme (grado IV)(también se le denomina glioblastoma secundario). Alternativamente esta neoplasia de alto grado puede presentarse de novo, sin evidencias de evolución previa a través de formas de menor grado de malignidad. Los tumores con diferenciación oligodendroglial suelen presentarse como formas de grado II que evolucionan hacia tumores anaplásicos de grado III. Los meningiomas, generalmente considerados como tumores de grado I desde el punto de vista histológico, pueden mostrar signos de agresividad (histológica y clínica) evolucionando hacia formas atípicas de grado II o anaplásicas (grado III).

Nuestro interés está centrado en el estudio de las alteraciones genómicas responsables de la evolución de dichas formas neoplásicas, tratando de explorar su posible valor predictivo de la progresión neoplásica. En los gliomas hemos identificado mecanismos moleculares distintos, en los tumores astrocíticos y oligodendrogliales, para la génesis de formas de bajo grado de malignidad, y actualmente estamos analizando la implicación de *MTS1*, *MTS2*, *PTEN/MMAC1* y *DMBT1* en la progresión de ambos subtipos de gliomas. Por otra parte, los glioblastomas de presentación de novo parecen responder a un modelo de progresión molecular distinto del que caracteriza a los tumores secundarios.

El estudio en meningiomas se ha orientado hacia las formas de presentación esporádica, comprobándose que aproximadamente el 40% resultan de inactivación del gen *NF2* (localizado en 22q12) tras delección y mutación del alelo retenido. Se han identificado diversos tipos de mutación inactivante de este gen que, mayoritariamente, originan un producto proteico truncado. El análisis de las formas atípicas o anaplásicas ha demostrado la acumulación de alteraciones en otras regiones del genoma, secundarias a la inactivación de *NF2*: preferentemente pérdidas alélicas a nivel de 1p (ver la figura adjunta) y 14q.

Como quiera que también hemos encontrado una alta tasa de alteraciones de 1p en oligodendrogliomas (75% de tumores) y en neuroblastomas (30% de muestras), estamos efectuando una cartografía de delección, a través del estudio de microsatélites, que incluye alrededor de 30 loci. Existen evidencias citogenéticas y moleculares previas que sugieren la localización aquí de un mínimo de cuatro genes de carácter oncosupresor, por lo que el establecimiento de mapas de delección nos permitirá determinar la posible implicación de distintos genes oncosupresores en las diferentes neoplasias de origen nervioso.

Publicaciones

- Gómez L, Rubio MP, Martín MT, Vázquez JJ, Idoate M, Pastorfide G, Pestaña A, Seizinger BR, Barnhill RL, Saez-Castresana J (1996). Chromosome 17 allelic loss and NF1-GRD mutations do not play a significant role as molecular mechanisms leading to melanoma tumorigenesis. *J. Invest. Dermatol.* 106, 432-436.
- Castresana JS, Gómez L, Pestaña A, García-Miguel P, Queizán A, Martín R, Nistal M, Santamaría L. (1996). Correlation of PCNA expression with clinico-pathologic features of neuroblastoma. *Int J. Dev. Biol.* S1, 307S-308S.
- Castresana JS, Gómez L, García-Miguel P, Queizán A, and Pestaña A. (1997). Mutational analysis of the p16 gene in human neuroblastomas. *Molecular Carcinogenesis* 18, 129-133.
- Pestaña, A (1977). Quince años de investigación del síndrome del aceite tóxico. *Medicina Clínica (Barcelona)* 108, 421-423.
- Pestaña, A, Martí S (1996). Ciencia e ideología, la cultura de la biología. *QUARK* 5, 61-67
- Pestaña, A. (1996). El sistema español de ciencia y técnica. *Investigación y Ciencia* 243, 6-13.
- Pestaña A. (1997). La Investigación de síndrome del aceite tóxico. *Mundo Científico* 176, 131-135.
- Pestaña A. (1997). El MedLine como fuente de información bibliométrica de la producción española en biomedicina y ciencias médicas. Comparación con el Science Citation Index. *Medicina Clínica (Barcelona)* 109, 506-511

Palabras clave

Neoplasmas neurogénicos, astrocitomas, gliomas, meningiomas, neuroblastomas, anomalías cromosómicas, genes supresores, análisis mutacional, deleciones cromosómicas

Progresión maligna en la carcinogénesis de piel de ratón

Investigador principal:	Quintanilla, Miguel, Colaborador Científico
Investigador contratado:	Iglesias, Maite (1997)
Investigador asociado:	Cano, Amparo, Profesora Titular UAM
Becarios predoctorales:	Scholl, Francisco G. Frontelo, Pilar Santibáñez, Juan F. Illescas, Damaris Berlanga, Oscar (1997)
Colaboraciones :	Gamallo, Carlos (Dpto. Anatomía Patológica. Hospital La Paz, Madrid) Fabra, Angles (Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynals, Barcelona) Vilaró, Senén (Univ. de Barcelona) Ramón y Cajal, Santiago (Dpto. Anatomía Patológica. Hospital Puerta de Hierro, Madrid) Martínez, Jorge (INTA-Univ. Chile, Santiago (Chile)) Larcher, Fernando (CIEMAT, Madrid)

Caracterización de antígenos tumorales inducidos durante la carcinogénesis

(F.G. Scholl, C. Gamallo, S. Vilaró, D. Illescas 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 células de carcinoma epidermoide y seleccionados por su expresión diferencial en células normales y transformadas. Con el antígeno PC2.27, una proteína del citoesqueleto, probablemente una queratina, se ha realizado un estudio de su expresión en el cáncer de mama humano, ya que el anticuerpo reconoce la proteína humana. Este estudio sugiere que la proteína PC2.27 podría ser útil como marcador de diagnóstico/pronóstico en el cáncer humano. Por otro lado, se ha conseguido una detallada caracterización bioquímica, así como la purificación y secuenciación de dos fragmentos peptídicos del antígeno PA2.26, que han conducido al aislamiento de su cDNA y a su identificación molecular. El antígeno PA2.26 es una sialoglicoproteína transmembrana de la superficie celular presente en queratinocitos transformados y en fibroblastos "activos" en cultivo. In vivo está ausente de la piel normal, aunque se expresa en otros tejidos como pulmón y cerebro, y se induce en tumores de piel durante la carcinogénesis química y en queratinocitos (y células fibroblásticas de la dermis) durante la cicatrización de heridas. Estudios de microscopía confocal y experimentos con drogas que afectan a la motilidad celular y a la integridad del citoesqueleto de actina apuntan a una interacción de esta proteína con microfilamentos y a un papel en la migración celular.

En este proyecto ha colaborado económicamente la empresa Biosystems SA (Barcelona)

El factor TGF- β 1 como modulador del fenotipo epitelial en células de carcinoma epidermoide. Implicaciones en la progresión maligna.

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

Nuestros estudios sobre el efecto de TGF- β 1, un inhibidor del crecimiento de células epiteliales, en la proliferación y diferenciación de queratinocitos normales y transformados revelan que en células de carcinoma epidermoide que escapan al bloqueo de la proliferación, el factor induce una conversión epitelial-fibroblástica asociada a un cambio en el fenotipo tumoral de carcinoma bien diferenciado a carcinoma fusocelular. Estos resultados, junto con datos de la

literatura que apuntaban a un efecto supresor de TGF- β ₁ en la formación de carcinomas, nos llevaron a postular una función dual del factor en la carcinogénesis como supresor de las etapas tempranas de la progresión maligna y estimulador de la invasión/metástasis y de la transición carcinoma epidermoide-carcinoma fusocelular en la progresión tardía.

En este período hemos iniciado un estudio del efecto de TGF- β ₁ en la expresión y secreción de proteasas de la matriz extracelular. Nuestros resultados demuestran que el factor estimula, en queratinocitos transformados pero no en queratinocitos normales, la expresión de componentes del sistema de la uroquinasa (uPA) así como de la metaloproteasa MMP-9. Ambas proteasas han sido implicadas en la invasión y metástasis en diferentes sistemas tumorales. Por otro lado, variantes clonales con fenotipo epitelioide o fibroblastoide derivadas por tratamiento con el factor adquieren la capacidad metastásica. En relación con la inducción de uPA por TGF- β ₁ se están estudiando los eventos intracelulares implicados en su estimulación. Resultados preliminares sugieren una implicación de la vía de señalización mediada por p21 ras.

Asimismo, se ha iniciado durante 1997 un estudio de los reguladores intracelulares: sistema de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores, Smads, que median las respuestas a TGF- β en queratinocitos normales y transformados.

Efectos del factor de crecimiento HGF en queratinocitos de epidermis

(O. Berlanga y M. Quintanilla)

Durante el año 1997 hemos comenzado un estudio sobre los efectos de HGF en el crecimiento y diferenciación de queratinocitos normales y transformados. Los resultados obtenidos indican que HGF induce la motilidad y dispersión de queratinocitos en cultivo, mientras que no afecta la proliferación de las células. El efecto se produce tanto en queratinocitos inmortalizados como en líneas derivadas de tumores (papilomas benignos y carcinomas) aunque es más pronunciado en estas últimas. Se está analizando el efecto de HGF en la expresión y actividad funcional de los complejos de adhesión intercelular cadherina-cateninas.

Papel de cadherina E en la invasión y metástasis

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

Hemos estudiado el papel de la proteína de adhesión intercelular cadherina E en la capacidad metastásica 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 metastásica de las células, ensayada *in vivo* en ratones atómicos, es independiente de la expresión *per se* de cadherina E. La pérdida del potencial metastásico correlacionó con una disminución de la expresión del mRNA y p21 H-ras oncogénica, así como con la reducción en la expresión de VEGF, un factor promotor de angiogénesis que se induce durante la carcinogénesis como consecuencia de alteraciones en el gen ras (este último estudio realizado en colaboración con F. Larcher, CIEMAT, Madrid). La expresión de cadherina E, sin embargo, correlacionaba 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 en la expresión 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 metastásico es un fenotipo complejo en el que intervienen numerosos factores genéticos y epigenéticos. Un estudio realizado en colaboración con el grupo del Dr. A. Balmain (Beatson Institute, Glasgow, Escocia) en ratones "knock-out" para la p53, que presentan un alto riesgo para la progresión maligna, mostró que las alteraciones en la expresión de cadherina E son un evento temprano y asociado a la invasión de la dermis por células de carcinoma.

El gen E1A de adenovirus como supresor tumoral. Implicaciones para la terapia génica

(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. Un estudio en líneas celulares derivadas de carcinomas de piel de ratón y de carcinomas humanos, transfectadas con vectores que contienen la región 13S E1A, mostró que la expresión de esta proteína inducía en las líneas celulares una alta sensibilidad a muerte celular por cisplatino y radiación gamma, independientemente del status de la proteína p53 y de otras alteraciones genéticas (ras). Por otro lado, E1A mostró un efecto supresor *in vivo*, en tumores inducidos mediante la inyección de las células en ratones atímicos. Se obtuvo un efecto similar mediante la inyección (concomitantemente a la inyección de células de carcinoma o mediante inyección intratumoral) de células productoras de retrovirus E1A. Se está analizando el efecto *in vivo* de la infección con adenovirus, la sensibilidad de los tumores que expresan E1A a quimio- y radioterapia, así como la región de la proteína E1a implicada en los efectos antitumorales.

Análisis de la actividad antitumoral de extractos de plantas iberoamericanas

(P. Frontelo, F.G. Scholl, O. Berlanga y M. Quintanilla)

En este proyecto de investigación aplicada, realizado en colaboración con la empresa ASAC Pharmaceutical International (Alicante), se analiza el efecto de extractos de plantas iberoamericanas en la proliferación y diferenciación de queratinocitos normales y transformados en cultivo y en el crecimiento tumoral *in vivo*, en tumores inducidos en ratones atímicos con líneas celulares de carcinomas murinos y humanos.

Publicaciones

- Caulín C, López-Barcons Ll, González-Garrigues M, Navarro P, Lozano E, Rodrigo I, Gamallo C, Cano A, Fabra A and Quintanilla M. (1996). Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced levels of Harvey-ras oncogene products. *Mol. Carcinog.* 15, 104-114.
- Cano A, Gamallo C, Kemp CJ, Benito N, Palacios J, Quintanilla M and Balmain A. (1996). The expression pattern of the cell adhesion molecules E-, P-cadherin and $\alpha 6\beta 4$ integrin is altered in premalignant skin tumors of p53 deficient mice. *Int. J. Cancer.* 65, 254-262.
- Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Lleonart M, Martín P, Anaya A and Ramón y Cajal S. (1996). Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 13, 1083-1092.
- Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti CJ and Jorcano JL. (1996). Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res.* 56, 5391-5396.
- Gandarillas A, Scholl FG, Frontelo P, Caulín C, Benito N, Gamallo C y Quintanilla M. (1996). Transdiferenciación epitelial-mesenquimática y progresión maligna en la carcinogénesis de piel de ratón. En: Bases moleculares del cáncer. Aplicaciones clínicas. (Olaetxea EB, Lacal JC y Perona R, eds.). Farmaindustria Serie Científica, Madrid, pp 171-178.
- Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C and Quintanilla M. (1997). Induction of

PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 10-18.

Sánchez-Prieto R, Martín Duque P, Leonart M, Romero J, Quintanilla M, Cano A y Ramón y Cajal S. (1997). El gen E1A de adenovirus: Actividad terapéutica en patología tumoral. *Oncología* 20, 723-733.

Patentes

Miguel Quintanilla, Carlos Gamallo y Alberto Gandarillas

Título: Anticuerpo monoclonal PC2.27 asociado a tumores. N° De Registro: 9600750.

Años: 1996, 1997. Entidad Titular: CSIC/Universidad Autónoma de Madrid. Países: España

Palabras clave

Carcinogénesis, invasión, metástasis, PA2.26, TGF- β , HGF, cadherina E, E1A

Comunicación intercelular en células normales y tumorales

Investigador principal:	Villalobo, Antonio, Investigador Científico.
Profesores visitantes:	Benaim, Gustavo, Universidad Central de Venezuela, Caracas. Vercesi, Anibal E. (1997) Universidad de Campinas, Campinas, SP, Brazil.
Investigador contratado:	Martín-Nieto, José (hasta Abril 1997).
Becarios y estudiantes visitantes:	Suju, Meylin (1996) Universidad Central de Venezuela Caracas. Siedemberg, Markus (1996) Technische Universität Hannover, Medizinische Hochschule Hannover, Alemania. Hernández, Silvia (1996) UAM Couso, Aldina (1996) UAM Bélangier, Diego (1996) UAM Sánchez, Cristina (1997) UAM Jiménez, Cristina (1997) UAM
Becarios predoctorales:	García-Nieto, Rosa María Palomo-Jiménez, Paloma I. (desde Octubre 1996) Horcajadas, José Antonio (hasta Septiembre 1996). Ruiz, Felix (hasta Septiembre 1996). Hernández, Silvia (desde Octubre 1997).
Personal de apoyo:	Jiménez, Amparo Gómez, Carmen (1996).

El interés científico de nuestro grupo se centra en el estudio de diversos sistemas implicados en la comunicación intercelular y sus alteraciones en células tumorales.

Adenililación de proteínas de la membrana plasmática en células hepáticas normales y tumorales.

(R. M. García-Nieto y A. Villalobo)

Desde hace unos años, venimos trabajando en un sistema de adenililación de proteínas. Hemos demostrado que ciertas glicoproteínas de la membrana plasmática de células hepáticas normales de rata (gp130, gp120, gp110 y gp100) y de células ascíticas del hepatocarcinoma de rata AS-30D (gp125, gp115 y gp105) se adenililan reversiblemente en residuos de treonina usando ATP como sustrato. Las gp120 y gp110 de tejido normal forman homo o hetero dímeros unidos por puentes disulfuro y las hemos purificado mediante cromatografía de afinidad en columnas de ATP-agarosa o de AMP-agarosa. Esto nos ha permitido caracterizar las actividades 5'-fosfodiesterasa y nucleótido-pirofosfatasa de estas proteínas que son estimuladas por Zn^{2+} . Estas dos proteínas forman intermediarios catalíticos adenililados ya que la velocidad de recambio del AMP es alta cuando se ensayan una vez purificadas. Por el contrario, la baja velocidad de recambio del AMP en las cuatro proteínas de la membrana plasmática cuando se ensayan en sus formas nativas unidas a la membrana, sugiere que este sistema está altamente regulado, y que presumiblemente algún(os) inhibidor(es) endógeno(s) presente(s) en la membrana plasmática podría(n) ser responsable(s) de este fenómeno. Adicionalmente, hemos ahondado en la identificación del/los dímero(s) gp120-gp110 usando anticuerpos contra el antígeno de diferenciación-1 de células plasmáticas (proteína denominada PC-1) que también tiene las actividades enzimáticas antes mencionadas, lo que sugiere su identidad o analogía. En las células tumorales, por el contrario, no se detectó inmunorreactividad con estos anticuerpos, y las tres glicoproteínas adenililadas poseen una actividad de adenililación

menor o se expresan en menor cantidad que en tejido normal. No obstante, hemos demostrado que las proteínas adenililables de estas células tumorales tienen el sitio de unión del sustrato ATP en dominios extracelulares, por lo que parecen estar envueltas en el metabolismo del ATP extracelular y/o la señalización mediada por éste.

La señal del calcio y la regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por el sistema calmodulina/fosfocalmodulina.

(J. Martín-Nieto, P. I. Palomo-Jiménez, M. Suju, F. Ruiz, S. Hernández, R. M. García-Nieto, G. Benaim y A. Villalobo)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) participa en procesos de proliferación y diferenciación celular. Durante la activación mitogénica mediada por este receptor se produce un aumento de la concentración del Ca^{2+} libre citosólico. Nuestro grupo identificó hace algunos años que el complejo Ca^{2+} -calmodulina inhibe la actividad tirosín-quinasa del EGFR y que dicho receptor fosforila a la calmodulina (CaM) en su Tyr99 con una estequiometría cercana a 1 (mol/mol) en presencia de un cofactor básico y ausencia de Ca^{2+} . El Ca^{2+} a concentraciones $\mu\text{molares}$ es un potente inhibidor de este proceso. Adicionalmente, hemos demostrado que la calmodulina fosforilada (P-CaM), en ausencia o presencia de Ca^{2+} , es un activador de la tirosín-quinasa del EGFR. La CaM de mamíferos contiene dos residuos potencialmente fosforilables por el EGFR (Tyr99 y Tyr138). El uso de CaMs aisladas de tripanosomatidios, en las que la Tyr99 está substituida por un residuo de Phe, pero en las que la Tyr138 está presente, nos ha permitido confirmar que la Tyr99, pero no la Tyr138, es fosforilada por este receptor. Adicionalmente, el uso de un anticuerpo monoclonal contra la CaM, que previene su fosforilación por el EGFR, y el uso de diversas CaMs de mamíferos y de tripanosomatidios como control negativo ha puesto en evidencia que la fosfo-Tyr99 de la CaM es esencial en este proceso de activación. Para un estudio diferencial detallado de los efectos de la CaM no fosforilada y la P-CaM sobre el EGFR, es necesario realizar una separación de ambas, ya que tienen efectos opuestos sobre la actividad tirosín-quinasa del receptor. Con dicho objetivo hemos desarrollado un sistema de purificación de P-CaM libre de CaM no-fosforilada en la que su paso esencial es una cromatografía de afinidad usando un anticuerpo anti-fosfoTyr inmovilizado. Por otro lado, usando una proteína de fusión hemos identificado el sitio de unión de la CaM en el EGFR, cuya secuencia es Arg₆₄₅-Arg-Arg-His-Ile-Val-Arg-Lys-Arg-Thr₆₅₄-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln₆₆₀. Este sitio está localizado en la región citosólica yuxtamembranal del receptor y está altamente conservado en vertebrados. Finalmente, hemos puesto en evidencia un mecanismo de comunicación cruzada entre la CaM y la proteína quinasa C (PKC), que fosforila a la Thr654 localizada en el sitio de unión de la CaM del receptor. Así, la unión de la CaM a la mencionada región previene la posterior fosforilación de la Thr654 por PKC y recíprocamente, la fosforilación previa del sitio de unión de la CaM del receptor por PKC previene la posterior unión de la CaM. Esta comunicación cruzada entre ambos mecanismos sugiere que la unión de CaM al receptor y la fosforilación de éste por PKC podrían regular el destino alternativo del EGFR una vez transmitida su señal mitogénica. Estos resultados ponen de manifiesto el importante papel que juega la CaM y el incremento transitorio de la concentración citosólica del calcio libre durante la activación mitogénica.

Regulación de la proliferación celular por el óxido nítrico.

(C. Gómez, S. Hernández, J. Martín-Nieto, M. Siedemberg, A. Jiménez, C. Estrada y A. Villalobo)

Entre las múltiples funciones fisiológicas del óxido nítrico (NO) parece encontrarse la regulación de la proliferación celular. Nuestro grupo ha investigado esta posibilidad y ha demostrado que diversos donadores de NO inhiben la replicación del DNA de fibroblastos murinos transfectados que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. Paralelamente a este fenómeno, se observó una inhibición de la transfosforilación y la actividad tirosín-quinasa del EGFR sobre sustratos exógenos mediante el uso de células permeabilizadas. La inhibición de estas actividades fue confirmada usando un

EGFR aislado de hígado de rata. Sin embargo, el NO no afecta los parámetros de unión del EGF al receptor. También demostramos que la especie química responsable de esta inhibición era el NO directamente y no el ion peróxido nítrico (ONOO⁻), producto del metabolismo de éste. Por otro lado, observamos que dicha inhibición era revertida por un agente reductor, por lo que se concluyó que el mecanismo molecular de acción del NO era la S-nitrosilación del receptor. Finalmente, pusimos de manifiesto que el NO también inhibe la transfosforilación del EGFR en células intactas.

Papel de los canales intercelulares comunicantes en la proliferación celular.

(J. Martín-Nieto, J. A. Horcajadas y A. Villalobo)

Las uniones intercelulares comunicantes están formadas por canales constituidos por conexinas que permiten el paso directo de metabolitos, iones y segundos mensajeros de masa molecular inferior a 1 kDa entre los citosoles de células adyacentes. Así, intervienen en el acoplamiento electrotónico y la sincronización de las actividades de las células que forman los tejidos de organismos multicelulares. Durante la proliferación celular existe un aumento considerable del recambio de las uniones intercelulares comunicantes, desapareciendo transitoriamente el acoplamiento intercelular mediado por éstas. Nuestro grupo ha demostrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fosforila directamente a la conexina-32, proteína constitutiva de las uniones intercelulares comunicantes de hígado de rata. Entre los objetivos abordados está el estudio del/los residuo(s) de Tyr de la conexina-32 fosforilado(s) por el EGFR.

Efectos antimitogénicos de lectinas específicas de β -galactósidos.

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

Las lectinas son un grupo amplio de proteínas de origen animal y vegetal que reconocen específicamente residuos glicosilados de diversos glicoligandos. De especial interés es el estudio de los mecanismos de transducción de señales empleados por las lectinas endógenas animales para inducir respuestas celulares. En este sentido, se sabe que algunas lectinas son potentes agentes mitogénicos y antimitogénicos. Con el objeto de identificar el mecanismo de acción de las lectinas en este contexto, estamos utilizando algunas lectinas específicas de β -galactósidos de origen animal y vegetal para estudiar la inhibición de la proliferación inducida por diversos factores mitogénicos en diversas líneas de células normales y tumorales. Hasta la fecha hemos demostrado que la lectina VAA-I del muérdago es un potente inhibidor de la proliferación celular de todos los tipos celulares ensayados. Particularmente, el dímero completo de esta lectina inhibe la proliferación de células tumorales A431 muy efectivamente ($DI_{50} < 1$ ng/ml), mientras que las subunidades A y B aisladas presentan un menor efecto ($DI_{50} > 100$ ng/ml). Además, esta acción antimitogénica no parece deberse a la inhibición de la transfosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Publicaciones:

- Díez, J.A., and Villalobo, A. (1996). The reconstitution of gap junction channels: Liposomes as tools to assay the activity of channel-forming proteins. *In: Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes, Volume II: Models for Biological Phenomena* (Barenholz, Y., and Lasic, D.D. *Eds.*), CRC Press, Boca Raton, FL pp. 263-272.
- Villalobo, A., Gómez, C., and Estrada, C. (1996). The antiproliferative effect of nitric oxide in cultured fibroblasts may be mediated by its direct action on the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity. *In: The Biology of Nitric Oxide part 5.* (Moncada, S., Stamler, J., Gross, S., and Higgs, E. A. *Eds.*) Portland Press Ltd., London p. 130.

- Villalobo, A., Horcajadas, J.A., André, S., and Gabius, J.-H. (1997). Glycobiology of signal transduction. *In: Glycosciences: Status and Perspectives* (Gabius, H.-J., and Gabius, S. Eds.), Chapman & Hall GmbH, Weinheim pp. 485-496.
- De Frutos, T., Martín-Nieto, J., and Villalobo, A. (1997). Phosphorylation of calmodulin by permeabilized fibroblasts overexpressing the human epidermal growth factor receptor. *Biol. Chem.* 378, 31-38.
- Elxpuru, A., Martín-Nieto, J., Jiménez, A., Gómez, C., and Villalobo, A. (1997). Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor β (TGF β)-like activity but lack receptors with TGF β -binding capacity. *Mol. Cell Biochem.* 170, 153-162.
- Estrada, C., Gómez, C., Martín-Nieto, J., De Frutos, T., Jiménez, A., and Villalobo, A. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem. J.* 326, 369-376.
- Elvira, M., and Villalobo, A. (1997). Calmodulin prevents the proteolysis of connexin32 by *m*-calpain. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 42, 207-211.
- Martín-Nieto, J., and Villalobo, A. (1997) Implication of gap junctions in pathological processes (Review). *Electr. J. Pathol. Histol.* December Issue.

Palabras Clave:

Adenilación de proteínas, Calcio, Calmodulina, Conexinas, Fosfocalmodulina, Fosfodiesterasas, Nucleótido pirofosfatasa, Lectinas, Óxido nítrico, Receptor del factor de crecimiento epidérmico, Tirosín-quinasa, Uniones intercelulares comunicantes.

Departamento de Bioquímica y Genética de Levaduras

Análisis molecular de transportadores iónicos en levadura

Investigadora principal:	Eraso, Pilar, Profesora Titular UAM
Investigadores asociados:	Mazón, M ^a Jesús, IIB Molano, Jesús, Jefe Clínico, Hospital La Paz Portillo, Francisco, Profesor Titular UAM
Becarios predoctorales:	Falcón, Juan Manuel Marín, Mari Cruz (1997)

Mecanismo molecular de activación por glucosa de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura.

(M. C. Marín, P. Eraso)

La activación de la H⁺ATPasa por glucosa parece mediada por fosforilación del dominio regulador en el extremo carboxi-terminal de la proteína. En este proceso han sido implicadas varias kinasas, entre ellas la proteína-kinasa dependiente de calmodulina (CaM-kinasa), aunque el papel real de cada una de ellas no ha sido demostrado. Hemos estudiado el papel de la CaM-kinasa en la activación utilizando antagonistas específicos de calmodulina *in vivo e in vitro*. Los resultados obtenidos sugieren un efecto regulador de la calmodulina sobre la actividad basal de la H⁺ATPasa pero no relacionado con la activación por glucosa. Estos estudios no descartan la participación de la CaM-kinasa en la activación por glucosa por lo que actualmente estamos llevando a cabo la interrupción de los genes que codifican CaM-kinasas en *S.cerevisiae* (CMK1, CMK2, RCK1 y RCK2).

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 codifica la proteína CFTR, que contiene dos dominios transmembrana, dos dominios de unión a nucleótido y un dominio regulador. CFTR pertenece a la superfamilia de transportadores ABC y es un canal de iones Cl⁻. Estamos llevando a cabo un estudio de la relación estructura-función de la proteína CFTR utilizando como modelo una proteína de levadura que presenta una gran homología con ella, la proteína transportadora de cadmio YCF1. Mediante mutagénesis dirigida se han introducido en YCF1 una serie de mutaciones análogas a mutaciones encontradas en pacientes de FQ en el gen CFTR. Se han caracterizado estos mutantes *ycf1* midiendo su nivel de resistencia a cadmio, la localización de la proteína y el transporte dependiente de YCF1 en vesículas vacuolares. Se han elegido dos de las mutaciones que afectan a la función de YCF1 y no a su localización para llevar a cabo un análisis de supresión intragénica.

Publicaciones

- Portillo, F., Eraso, P. and Serrano, R. (1996). The plasma membrane H⁺-ATPase from fungi and plants. En "Biomembranes", vol 5, A.G. Lee ed., JAI Press Inc. pp 225-240.
- Escribano, V., Eraso, P., Portillo, F. y Mazón, M.J. (1996). Sequence analysis of a 14.6 kb DNA fragment of *S.cerevisiae* chromosome VII reveals SEC27, SSM1b, a putative S-adeosylmethionine-dependent enzyme and six new open reading frames. *Yeast* 12,

887-892.

- Tettelin, H., ...Eraso, P., Escribano, V.,... Portillo, F., ...Mazón, M. J....(1997). (En este artículo firman, por orden alfabético, el resto de los autores participantes en la secuenciación del cromosoma VII de *S.cerevisiae*). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. Nature 387, 81-84.
- Romero, I., Maldonado, A. M. y Eraso, P. (1997). Glucose-independent inhibition of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase by calmodulin antagonists. Biochem. J. 322, 823-828

Palabras clave

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

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

Investigador principal: Gancedo, Carlos

Becarios predoctorales: Lafuente, María Jose
Petit, Thomas
Flores, Carmen-Lisset
Menéndez, Javier (Noviembre 1996-Noviembre1997).
Rodríguez, Cristina (desde Enero 1997)
Obies, Clara (desde Mayo 1996)

Personal de apoyo: Bermúdez de Castro, M^a Isabel

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

(C. Gancedo, María José Lafuente, Thomas Petit, Carmen-Lisset Flores, Cristina Rodríguez, Javier Menéndez).

En el estudio de mutantes que suprimen los efectos tóxicos de azúcares sobre diversos mutantes glicolíticos se ha continuado estudiando la mutación *DGT1-1* (supresor de efectos sobre *gpm1*) Se ha demostrado que ese gen mutante es portador de dos mutaciones que alteran los aminoácidos 85 y 102. Asimismo se ha mostrado que la mutación *BPC1-1* (supresor de efectos sobre *pyc1pyc2*) es alélica con la anterior y porta una mutación que altera el aminoácido 85.

Se ha complementado la mutación *pyc1pyc2* de levadura con el gen *ppc* de *E. coli* y se han estudiado los cambios metabólicos en la levadura transformada. Siguiendo con los estudios sobre piruvato carboxilasa se ha clonado el gen *PYCI* de *Pichia pastoris* y se ha aislado un supresor del fenotipo *pyc*. Asimismo se han caracterizado las zonas reguladoras de los promotores de los genes *PYCI* y *PYC2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

En relación con los efectos de trehalosa-6-P sobre el flujo glicolítico se han caracterizado las hexokinasa de *Schizosaccharomyces pombe* y clonado los genes codificantes. Se realizó un trabajo similar en la levadura *Yarrowia lipolytica*. Se han expresado estas kinasas en *S. cerevisiae* y se ha estudiado su influencia en el flujo glicolítico y la represión catabólica. La conclusión es que tanto la estructura como la función de las hexokinasa parecen importantes en su función en la represión catabólica.

Secuenciación y análisis funcional del genoma de levadura

(C. Gancedo, María Jose Lafuente, Clara Obies)

Se ha continuado la participación en el programa europeo de secuenciación y análisis funcional del genoma de la levadura. Se han interrumpido seis tramas abiertas de lectura de función desconocida, sin que en ningún caso se haya detectado efecto fenotípico notable. Se han comenzado a cuantificar diversos parámetros relacionados con el metabolismo glucídico en la colección de interrupciones generada en el proyecto europeo Eurofan.

Publicaciones

Petit T., Blázquez M.A. and Gancedo C.(1996). *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases. FEBS Lett. 378, 185-189.

Gamo F.J., Lafuente M.J., Casamayor A., Ariño J., Aldea M., Casas C., Herrero E., and Gancedo C.(1996). Analysis of the DNA sequence of a 15000 bp fragment near the left telomere of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a putative sugar transporter, a carboxypeptidase homologue and two new open reading frames. Yeast 12, 709-714 .

- Lafuente M.J., Gamo F.J., and Gancedo C.(1996). DNA sequence analysis of a 10624 bp fragment of the left arm of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a RNA binding protein, a mitochondrial protein,two ribosomal proteins and two new open reading frames. *Yeast* 12, 1041-1045.
- François J.M., Blázquez M.A., Ariño J. and Gancedo C. (1997). Storage carbohydrates in yeast. en "Yeast sugar metabolism". Zimmermann F. y Entian K.D. editores. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA. pp. 285-312.
- Gancedo J.M. and Gancedo C. (1997). Gluconeogenesis and catabolite inactivation en "Yeast sugar metabolism". Zimmermann F. y Entian K.D. editores. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA. pp. 359-378 .
- Flores C.L. and Gancedo C.(1997). Expression of PEP carboxylase from *Escherichia coli* complements the phenotypic effects of pyruvate carboxylase mutations in *Saccharomyces cerevisiae* . *FEBS Lett.* 412, 531-534 .
- Dujon B., Gamo F.J., Gancedo C., Lafuente M.J. and Kleine K. (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature* 387, 98-102 .
- Lafuente M.J., Petit T. and Gancedo C. (1997). A series of vectors to construct lacZ fusions for the study of gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters* 420, 39-42.

Palabras clave

Levadura, glicolisis, hexokinasa, piruvato carboxilasa

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

Investigadora principal: Lagunas, Rosario, Profesora de Investigación.

Becarios predoctorales: Lucero, Pilar
Peñalver, Élica

Personal de apoyo: Moreno, Eulalia

Papel de la ubiquitina en la señalización de proteínas en endocitosis

(Pilar Lucero y Rosario Lagunas)

Se ha investigado el posible papel de la vía de la ubiquitina en la endocitosis de proteínas de membrana plasmática en *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando el transportador de maltosa como modelo y mutantes deficientes en una ubiquitin-proteína-ligasa y una ubiquitina-proteína-hidrolasa, hemos mostrado que ambas enzimas son necesarias para la endocitosis del transportador. Los resultados indican que la ubiquitina interviene en la internalización de la proteína. Estamos investigando esta posibilidad.

Papel del citoesqueleto en la endocitosis

(Élica Peñalver y Rosario Lagunas)

Se ha investigado el papel de algunos componentes del citoesqueleto en la endocitosis del transportador de maltosa. Utilizando mutantes defectivos en β -tubulina, actina, y las proteínas Sac6 y Abp85 que ligan actina, así como también nocodazol que inhibe la formación de microtúbulos, hemos mostrado que los microfilamentos de actina participan en la endocitosis mientras que los microtúbulos no participan. Estamos investigando que proteínas de revestimiento de vesículas participan en la endocitosis.

Inhibición de la endocitosis por concentraciones moderadas de etanol

(Eulalia Moreno y Rosario Lagunas)

Hemos observado que concentraciones moderadas de etanol (2-6%, v/v) inhiben la endocitosis en levadura. Hemos investigado el mecanismo de esta inhibición y hemos concluido que se debe a cambios en la estructura de la membrana plasmática que afectan, en particular, a la endocitosis. La inhibición de la endocitosis a estas concentraciones de etanol, que son menores que las que se encuentran en los hábitats naturales de la levadura, plantea dudas sobre la relevancia de la endocitosis en este organismo. Estamos investigando la posible existencia de mecanismos de resistencia al efecto inhibitorio del etanol.

Publicaciones

Lucero, P. and Lagunas, R. (1997). Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. FEMS Microbiol. Lett. 147, 273-277.

Peñalver, E., Ojeda, L., Moreno, E. and Lagunas, R. (1997). Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. Yeast 13, 541-549.

Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E. and Lagunas, R. (1997). Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3831-3836.

Patente

1. Lagunas, R. y Moreno, E. (1996) Procedimiento para estabilizar la capacidad fermentativa de la levadura mediante la adición de alcoholes. CSIC. N° de solicitud: 9601615

Palabras clave

Endocitosis, recambio de proteínas, transporte de azúcares, inactivación catabólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

Análisis funcional de genes de levadura

Investigadora principal	Mazón, M ^a Jesús, Investigadora Científica
Becarios predoctorales	Escribano, Victoria Silles, Eduardo (desde febrero 1997)
Investigadores asociados	Eraso, Pilar, Profesora Titular UAM Portillo, Francisco, Profesor Titular UAM Molano, Jesús, Jefe Clínico, Hospital La Paz
Personal de apoyo	Morgado, Eulalia

Análisis funcional de genes de levadura

(Victoria Escribano y María Jesús Mazón)

Dentro del programa europeo Eurofan se ha procedido a la interrupción de seis genes identificados en nuestro laboratorio durante la secuenciación del genoma de levadura y al análisis fenotípico de los correspondientes mutantes nulos. Entre los resultados obtenidos cabe destacar la identificación del gen *YGL142c* como el homólogo estructural y funcional en *S.cerevisiae* del gen humano *PIG-B*. La proteína codificada por este gen participa en la síntesis del glicosilfosfatidil inositol (GPI) que ancla numerosas proteínas a la membrana. Concretamente *Ygl142c* es necesaria para la transferencia de la tercera manosa al precursor GPI y la interrupción del gen es letal para la levadura.

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

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

Continuando con el estudio de la relación estructura-función de la proteína CFTR utilizando el gen *YCF1* de *S.cerevisiae* como modelo, estamos interesados en conocer la importancia de la fosforilación en la funcionalidad de *Ycf1p*. Hemos mutagenizado el único residuo capaz de ser fosforilado, en la proteína de levadura, por la proteína quinasa dependiente de cAMP. La sustitución de la serina por un residuo de alanina destruye la función detoxificadora de *Ycf1p*, aunque la proteína es sintetizada y localizada normalmente en la vacuola. La introducción de un residuo de aspártico o de glutámico en sustitución de la serina, en cambio, permite que *Ycf1p* mantenga su función, indicando que la carga negativa en esa posición es necesaria para el mantenimiento de una estructura activa. Estamos también analizando posibles señales en el extremo amino de *Ycf1p* que puedan determinar su direccionamiento a vacuola así como la ruta que sigue *Ycf1p* hasta su localización en la membrana vacuolar, utilizando para ello la expresión del gen *YCF1* en distintos mutantes de la vía secretora.

Publicaciones

- Escribano, V., Eraso, P., Portillo, F. and Mazón, M.J. (1996). Sequence analysis of a 14.6 kb DNA fragment of *S.cerevisiae* chromosome VII reveals *SEC27*, *SSM1b*, a putative S-adenosyl-methionine-dependent enzyme and six new open reading frames. *Yeast* 12, 887-892.
- Tettelin, H.,Eraso, P.,.....Escribano, V.,.....Mazón, M.J.,Portillo, F.,and Kleine, K. (1997). (En este artículo firman, por orden alfabético, el resto de los autores participantes en la secuenciación del cromosoma VII de *S.cerevisiae*) The complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Nature* 387, 81-84.

Palabras clave

Interrupción génica, análisis fenotípico, estructura-función, CFTR, YCF1, localización subcelular, delección, mutagénesis dirigida.

Análisis Molecular de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

Investigador Principal: Portillo, Francisco, Profesor Titular UAM

Investigadores asociados: Mazón, M^a Jesús, IIB
Molano, Jesús, Jefe Clínico, Hospital La Paz
Eraso, Pilar, Profesor Titular UAM

Becarios predoctorales: Maldonado, Ana M^a (1996)
de la Fuente, Natalia

Análisis de supresores no específicos de alelo.

(Ana María Maldonado, Natalia de la Fuente y Francisco Portillo)

El análisis de supresión intragénica del alelo letal dominante *pma1-K474R* ha permitido identificar tres mutaciones (A165V, V169D/D170N y P536L) que se comportan como supresores no específicos de alelos ya que pueden suprimir mutaciones letales dominantes localizadas en diferentes regiones de la ATPasa. El análisis genético y bioquímico de mutantes en la Pro-536 (P536--> A, V, L, I, N, G, H, K, E) sugiere que este residuo no es esencial para la función del enzima pero sí importante para la biogénesis de la misma. La capacidad de supresión de las mutaciones letales dominantes está restringida a residuos pequeños e hidrofóbicos. La combinación de una mutación letal dominante y una mutación supresora en Pro-536 da lugar a una proteína activa que se localiza correctamente lo que sugiere que las mutaciones supresoras pueden afectar el plegamiento de las proteínas dominantes negativas.

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

(Natalia de la Fuente y Francisco Portillo)

La glucosa ejerce un control transcripcional y post-transcripcional sobre la ATPasa. A nivel post-transcripcional, la glucosa induce una activación de la ATPasa que es el resultado de una alteración de las constantes cinéticas del enzima: la K_m para el ATP disminuye y la V_{max} aumenta.

Se han aislado dos mutaciones que afectan dicho proceso. Se ha clonado el gen correspondiente al de una de las mutaciones y se ha encontrado que corresponde al gen RSP5. Este gen codifica una de las ubiquitina ligasa. Mutaciones en el gen RSP5 afectan la regulación de la ATPasa por glucosa impidiendo el cambio de K_m que tiene lugar durante la activación. También hemos encontrado que mutaciones en el 26S proteasoma alteran en el mismo sentido la activación de la ATPasa por glucosa. Estos resultados sugieren que una proteína susceptible de ser ubiquitinada y posteriormente degradada por el 26S proteasoma actúa como inhibidor de la activación de la ATPasa por glucosa.

Publicaciones

Portillo, F., Eraso, P. & Serrano, R. (1996) The Plasma Membrane H⁺-ATPase of fungi and Plants. En "Biomembranes, A Multivolume Treatise" A.G. Lee ed. Jai Press Inc., London, pp. 225-240.

Tettelin, H.,Eraso, P.,.....Escribano, V.,.....Mazón, M.J.,Portillo, F.,and Kleine, K. (1997). (En este artículo firman, por orden alfabético, el resto de los autores participantes en la secuenciación del cromosoma VII de *S.cerevisiae*) The complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. Nature 387, 81-

84.

Portillo, F. (1997) Characterization of dominant lethal mutations in the yeast plasma membrane H⁺-ATPase gene. FEBS Lett. 402, 136-140

De la Fuente, N., Maldonado, A.M. &Portillo, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. FEBS Lett. 411, 308-312.

De la Fuente, N., Maldonado, A.M. and Portillo, F. (1997) Yeast gene YOR137c is involved in the activation of the yeast plasma membrane H-ATpase. FEBS Lett. 420, 17-19.

Tesis doctorales

Ana Maria Maldonado Alconada

Análisis genético de los dominios funcionales implicados en la formación del intermediario fosforilado de la H⁺-ATPasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Francisco Portillo. Calificación: Apto “cum laude”.

Mariano Andrés García Arranz

Clonación y caracterización de un gen (APA1) implicado en el control de la expresión de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Francisco Portillo. Calificación: Apto “cum laude”.

Palabras clave

H⁺-ATPasa, membrana plasmática, activación por glucosa, *Saccharomyces cerevisiae*

Regulación de la expresión del gen *FBPI* y represión catabólica en levadura

Investigadora principal:	Sempere, Juana María (Gancedo) Profesora de Investigación
Becaria post-doctoral:	Yañez, Esther (Febrero-Octubre 1996)
Becarios predoctorales:	Freire de Mesquita, Joelma (hasta Octubre 1996) Rodríguez, Cristina (Enero-Diciembre 1996) Zaragoza, Oscar
Estudiante de intercambio:	Lindley, Christopher (Sept.1996-Agosto1997)

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

(J.F. de Mesquita, O. Zaragoza y J.M. Gancedo)

Se ha realizado un estudio funcional de los elementos UAS y se ha mostrado que la glucosa parece actuar a dos niveles: represión de la síntesis de proteínas que se ligan a los UAS e interferencia con su competencia para activar la transcripción. Por otra parte se está investigando de qué elementos depende la capacidad de la secuencia URS1 para actuar como represor de la transcripción y en qué circunstancias puede incluso actuar estimulando la transcripción.

Papel del cAMP en la represión catabólica

(C. Lindley, O. Zaragoza y J.M. Gancedo)

Utilizando una cepa de levadura sensible al cAMP extracelular, se ha observado que el cAMP interfiere con la transcripción del gen *FBPI* y que también inhibe la síntesis de otras enzimas sujetas a represión catabólica. Se está investigando si la proteína reguladora Mig1 se encuentra implicada en el proceso.

Comparación de las vías de señalización de glucosa y galactosa

(C. Rodríguez y J.M. Gancedo)

Se ha comprobado que la galactosa reprime la fructosa-1,6-bisfosfatasa en la misma medida que la glucosa pero es menos efectiva que este azúcar para reprimir otras enzimas como invertasa o glutamato deshidrogenasa. Al igual que la glucosa, la galactosa es capaz de provocar una subida en el nivel intracelular de cAMP, de inactivar la fructosa-1,6-bisfosfatasa y de inducir la piruvato decarboxilasa; en todos los casos, sin embargo, sus efectos son menos acusados que los de la glucosa.

Regulación del flujo glicolítico

(E. Yañez y J.M. Gancedo)

Se ha investigado la posibilidad de estimular el flujo glicolítico utilizando diversos abordajes: aumento del nivel de trehalosa-6P por interrupción del gen *TPS2* que codifica la trehalosa-6P fosfatasa, sobreexpresión de distintos genes que codifican enzimas glicolíticas, adición de acetaldehído al medio para estimular la reoxidación de NADH etc. En ningún caso se produjo un aumento en la capacidad de la levadura para fermentar glucosa.

Publicaciones

1. Navas M.A. and Gancedo J.M. (1996). The regulatory characteristics of yeast fructose-1,6-bisphosphatase confer only a small selective advantage. *J. Bacteriol.* 178, 1809-1812.
2. Gancedo J.M. and Gancedo C. (1997). Gluconeogenesis and catabolite inactivation. En "Yeast sugar metabolism". Zimmermann F. y Entian K.D. editores. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA. pp. 359-378 .

Palabras clave

cAMP, factores de transcripción, fructosa-1,6-bisfosfatasa, glicolisis, levadura, represión catabólica, trehalosa-6-fosfato, *Saccharomyces cerevisiae*

Departamento de Endocrinología Molecular

Patrones de expresión de genes regulados por la hormona tiroidea durante el desarrollo del cerebro

Investigador principal:	Bernal, Juan
Investigadores contratados:	Guadaño-Ferraz, Ana (Desde Agosto de 1995)
Investigadores visitantes:	Botazzi, Cristina (Noviembre/Diciembre de 1996)
Becarios predoctorales:	Morte, Beatriz (Desde Septiembre de 1993) Vargiu, Pierfrancesco (Desde Junio de 1994) Escámez, María José (Desde Enero de 1997) Lorenzo, Petra Isabel (Desde Septiembre de 1994)
Personal de apoyo:	Chacón, Gloria
Estudiantes de Licenciatura:	García, Gabriela (Julio y Septiembre 1996) Bravo, M ^a del Carmen (Julio y Septiembre 1997) Abajo, Ricardo de (A partir de Octubre de 1997)
Colaboraciones:	Muñoz, Alberto, IIB Obregón, M ^a Jesús, IIB Coloma, Antonio, Depto Bioquímica, UAM StGermain, Donald, Dartmouth Medical School

Regulación de la expresión de RC3/neurogranina.

(Beatriz Morte, Cruz Martínez, Miguel Angel Iñiguez, Ana Guadaño-Ferraz, Antonio Coloma, Juan Bernal)

RC3, también denominada neurogranina, es un gen específico de cerebro que codifica un sustrato de proteína kinsa C, que une calmodulina en ausencia de calcio. Se expresa en neuronas situadas fundamentalmente en corteza cerebral, hipocampo, caudado, amígdala y algunos núcleos del cerebro medio, no expresándose en cerebelo. Forma parte de un grupo muy conservado de proteínas, recientemente denominadas calpacitinas, como actúan como capacitadores, liberando calmodulina de forma rápida o lenta en función de la magnitud de incremento de calcio intracelular causado por diferentes estímulos. Otro miembro de esta familia es GAP-43, pero mientras ésta es axonal, RC3 es de localización dendrítica. Se ha propuesto que RC3 juega un papel importante en fenómenos de plasticidad sináptica, formación y remodelación de espinas dendríticas, por lo que su función puede ser relevante en funciones superiores como la memoria.

En estudios previos encontramos que RC3 es uno de los genes regulados por la hormona tiroidea en cerebro de rata. La hormona tiroidea es importante en el desarrollo del cerebro y en la función cerebral en el individuo adulto. Nosotros encontramos que la hormona tiroidea ejerce un control muy selectivo sobre determinadas poblaciones neuronales durante el período neonatal y en la rata adulta. Este control se ejerce a nivel de transcripción, tanto *in vivo* como en células en cultivo. El grupo de Antonio Coloma ha clonado el gen humano y ha determinado que la estructura del gen es idéntica al de rata, con una casi perfecta homología de secuencia del cDNA. La conservación se mantiene en las secuencias clonadas de animales de otras especies como la vaca, cabra y canario. La hormona tiroidea (T3) regula la expresión génica a través de receptores nucleares que se unen a secuencias específicas de DNA denominadas elementos de respuesta a T3 (T3RE) localizadas generalmente en las cercanías de la región promotora. En trabajos anteriores no conseguimos localizar un T3RE en la región 5' de RC3, tras analizar hasta 10 kb de secuencia "upstream". Sin embargo, recientemente (aún no publicado), hemos identificado un T3RE, del tipo DR4, en el primer intrón del gen humano a unas 3 kb del inicio de transcripción, y tenemos evidencias de que el gen de rata posee un T3RE en una posición similar. El resultado es importante porque 1) Indica que el gen humano se regula de igual forma que el gen de rata

por hormona tiroidea, lo que aumenta el valor de su estudio. 2) La presencia del T3RE en el intrón, en lugar de la región promotora, indicaría posiblemente peculiaridades en la regulación por T3 que quizás expliquen las especiales características que tiene la regulación del desarrollo del cerebro por esta hormona (Parte de estos resultados está aún sin publicar. El resto se ha publicado en *Endocrinology*, *Mol Brain Res*, *Genomics* y *J Neurochem*)

Regulación por hormona tiroidea de un nuevo gen de la familia ras expresado en núcleo estriado.

(Pierfrancesco Vargiu, Ricardo de Abajo, Juan Bernal, con la participación de las estudiante de Medicina Gabriela García y Maria del Carmen Bravo)

Continuando con la búsqueda de genes de cerebro regulados por la hormona tiroidea durante el desarrollo, hemos identificado un mRNA de 4 kb, SE6C, que se expresa de forma mayoritaria en el núcleo estriado, y cuya concentración disminuye drásticamente en ratas hipotiroideas. Otros genes específicos de núcleo estriado como la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina no se afectan por el estado tiroideo. La administración de una dosis aguda de T3 induce de forma rápida SE6C, normalizándose en 4-6 horas. La clonación del cDNA completo ha revelado que codifica una proteína con un dominio de unión a GTP homólogo al de las proteínas de la familia Ras. La transcripción/traducción del cDNA in vitro produjo una banda de Mr de 40K, de acuerdo con la traducción conceptual del cDNA, que arroja una Mr de 38.079. En la actualidad se está expresando la proteína en un sistema de expresión de E. coli con el objetivo de producir anticuerpos específicos (Estos resultados están aún sin publicar).

Expresión de desyodasas en cerebro de rata.

(Ana Guadaño-Ferraz, María José Escámez, María Jesús Obregón, Donald St Germain, Juan Bernal)

Una de las funciones más importantes de la hormona tiroidea es la regulación del desarrollo del cerebro. La hormona tiroidea mayoritaria es la T4, que origina la hormona activa, T3, en los tejidos diana por acción de enzimas denominadas desyodasas. Existen tres tipos de desyodasas denominadas D1, D2 y D3. Mientras que D1 y D2 generan T3 a partir de T4, la actividad de D3 degrada la T3 a T2, un producto inactivo. La actividad D2, presente principalmente en cerebro, es importante en la generación local de T3, que representa un 80% de la T3 total en este órgano. La actividad de D2 se incrementa en hipotiroidismo, lo que representa un mecanismo de defensa eficaz en circunstancias en las que disminuyen los niveles de T4, como el la deficiencia de yodo. Dada la importancia de la D2 en el metabolismo intracerebral de hormona tiroidea estudiamos la expresión regional del mRNA mediante hibridación in situ, lo que ha sido posible gracias a su reciente clonación.

En general, encontramos que D2 se expresa en regiones cerebrales dependientes de hormona tiroidea, pero con niveles muy altos, entre 5 y 10 veces los de otras regiones, en el tercio inferior de la pared del tercer ventrículo. El examen microscópico de preparaciones tras exposición de cortes de tejido procedentes de hibridación in situ a una emulsión fotográfica reveló un patrón de expresión predominante glial. En el tercer ventrículo/eminencia media D2 se expresa abundantemente en células gliales muy especializadas denominadas tanicitos, que revisten el suelo y tercio inferior del tercer ventrículo y emiten prolongaciones a la eminencia media. Estas células están especializadas en el transporte de sustancias entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la eminencia media, por lo que la D2 en esta localización puede jugar un importante papel en la regulación de la concentración de T3 en el LCR y en el control de la secreción adenohipofisaria. En el resto del cerebro, la D2 se expresa fundamentalmente en las prolongaciones de astrocitos. Esta localización es compatible con la hipótesis que hemos formulado por la que los astrocitos captarían T4 de los capilares, a partir de la cual producirían T3 en la cercanía de las neuronas. La T3 producida pasaría a las neuronas donde ejercería su papel de regulación de la expresión génica. En contra de lo que ocurre con D2, resultados preliminares indican que D3 se expresa fundamentalmente en neuronas, es decir que la degradación de T3 ocurriría en estas células (Parte de estos resultados se ha publicado en *PNAS* y parte está aún sin publicar).

Regulación de la expresión de alfa-tubulina.

(Petra Isabel Lorenzo, Juan Bernal)

En un estudio previo encontramos que la hormona tiroidea ejerce un control negativo sobre la transcripción de genes que se expresan de forma relativamente abundante durante las últimas etapas del período embrionario y los primeros días del período postnatal en la rata disminuyendo después su expresión. Entre estos genes estaban NCAM y alfa-tubulina. Presumiblemente la hormona tiroidea es importante para la disminución de la expresión de estos genes durante el período neonatal. En el trabajo que nos ocupa hemos estudiado la influencia de la hormona tiroidea en la expresión de alfa tubulina mediante hibridación in situ. Se realizó hibridación in situ con sondas radioactiva y colorimétricas, usando una ribsonda derivada del extremo 3' específico de alfa-1 tubulina. La expresión fue exclusivamente neuronal, expresándose prácticamente en todas las neuronas durante los primeros días del período neonatal, para ir después disminuyendo. Puesto que la expresión de alfa-tubulina está relacionada con procesos de diferenciación neuronal, es posible que la disminución de la expresión postnatal refleje la diferenciación terminal de grupos neuronales. En animales hipotiroideos la expresión de tubulina disminuye más lentamente, estando los niveles incrementados en relación a ratas normales de la misma edad. Es posible que esto sea un reflejo de un retraso global de la diferenciación terminal neuronal. Este retraso podría ser una consecuencia indirecta de la acción de la T3 a otro nivel, o ser una acción directa de la hormona sobre la expresión de tubulina a nivel genómico, coordinada con otras acciones sobre diferenciación neuronal. Esta posibilidad se sustenta en el hallazgo de un elemento de respuesta a T3 situado en el tercer exón que une el heterodímero RXR-T3R y confiere transactivación por T3R en ensayos con promotores heterólogos. La estructura del T3RE no es la consenso, sino del tipo DR3, más característico de los elementos de respuesta a vitamina D3. Los estudios actuales van encaminados a relacionar la acción de T3 a través de este T3RE con posibles acciones a nivel del promotor.

Publicaciones

- Iñiguez, M.A., Lecea, L. de, Morte, B., Gerendasy, D., Sutcliffe, J.G, y Bernal, J. (1996). Cell specific effects of thyroid hormone on RC3/neurogranin expression in rat brain. *Endocrinology* 137, 1032-1041.
- Iglesias, T., Caubín, J., Stunnenberg, H.G., Zaballos, A., Bernal, J. and Muñoz, A. (1996). Thyroid hormone-dependent transcriptional repression of neuronal cell adhesion molecule during maturation. *EMBO J.* 15, 4307-4316.
- López Baraona, M., Iglesias, T., García-Higuera, I., Mayor Jr., F., Zaballos, A., Bernal, J. and Muñoz, A. (1996). Posttranscriptional induction of β 1-adrenergic receptor by retinoic acid, but not triiodothyronine, in C glioma cells expressing thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* 135, 709-715.
- Bernal, J., Iñiguez, M.A., Morte, B., Guadaño-Ferraz, A., Lorenzo, P.I. and Vargiu, P. (1997). Control of the neuron-specific, protein kinase C substrate, RC3/neurogranin by thyroid hormone: a review. In: *Recent Research in Developmental Neuroendocrinology.* -"Thyroid hormone and brain maturation, 1977", Editors. Chester E. Endrich and Susan Porterfield. Research Signpost, Trivandrum, India. pp. 71-77.
- Martinez de Arrieta, C., Perez, L., Bernal, J. and A. Coloma. (1997). Structure, organization and chromosomal mapping of the human neurogranin gene (NRGN). *Genomics* 41, 243-249.
- Morte, B., Iñiguez, M.A., Lorenzo, P.I. and Bernal, J.(1997). Thyroid hormone-regulated

expression of Rc3/neurogranin in the immortalized hypothalamic cell line GT1-7. J. Neurochem. 69, 902-909.

Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Morte, B., Vargiu, P. and Bernal, J. (1997). Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. Mol. Brain Res. 49, 37-44.

García-Fernandez, L.F., Rausell, E., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J. and Muñoz, A. (1997). Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D2 synthase/beta-trace in specific areas of the developing rat brain. Eur. J Neurosci. 9, 1566-1573.

Muñoz, A. and Bernal, J. (1997). Biological activity of thyroid hormone receptors. Eur. J. Endocrinol. 137, 433-445.

Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., StGermain, D. and Bernal, J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10391-10396.

Tesis doctoral

Beatriz Morte Molina

“Mecanismo de acción de la hormona tiroidea en la regulación del gen neuronal RC3/neurogranina”. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 1997. Director: Juan Bernal. Calificación: Apto “cum laude”.

Palabras clave

astrocitos, calmodulina, cerebro, corteza cerebral, cretinismo, desarrollo cerebral, desdoyadasas, eminencia media, expresión génica, hipocampo, hipotiroidismo, hormona tiroidea, memoria, neurogranina, neuronas, núcleo estriado, proteína kinasa C, RC3, T3, T4, tanicitos, tiroides, tubulina.

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

Investigador principal:	Morreale de Escobar, Gabriela, Profesor de Investigación, Doctor vinculado "Ad Honorem" a partir de Junio 1995.
Investigadores asociados:	Escobar del Rey, Francisco, Profesor de Investigación (jubil), Doctor vinculado al IIB Obregón, M ^a Jesús, Investigador Científico
Investigadores asociados:	Escobar-Morreale, Hector, Hospital Ramón y Cajal, Madrid Ares, Susana, Unidad de Neonatología, Hospital "La Paz", Madrid Ruiz Marcos, Antonio, Prof. de Investigación, Instituto Cajal, Madrid Quero, José, Jefe de la Unidad de Neonatología, Hospital "La Paz". Tovar, Juan, Jefe de Cirujía Infantil, Hospital "La Paz", Madrid Forrest, Douglas, Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine. Nueva York
Becarios postdoctorales:	Asunción, Miryam
Becarios predoctorales:	Pedraza, Pablo Enrique Lavado, Rosalía
Personal de apoyo:	Durán, Socorro Presas, M ^a Jesús

Interrelaciones entre hormonas tiroideas y sus enzimas desyodantes, en ratas adultas.

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

Se tiroidectomizaron ratas hembras adultas, que se infundieron posteriormente durante dos semanas con diferentes dosis de T4, de T3, o de placebo, cubriendo un amplio rango de concentraciones, de forma que había grupos deficientes en hormonas tiroideas (hipotiroideos) y grupos que recibían un exceso (hipertiroideos). Se determinaron las concentraciones de T4 y T3 circulantes y en numerosos tejidos, así como las actividades de diferentes enzimas desyodantes, en hígado, pulmón, corteza cerebral, tejido graso pardo e hipófisis. En animales tiroidectomizados infundidos con placebo, hay una elevación marcada de la actividad del enzima 5'D-II en corteza cerebral, tejido adiposo pardo e hipófisis; su actividad sólo se normaliza cuando se infunde T4, lo que también normaliza las concentraciones de T3. No se normaliza infundiendo sólo T3, ni siquiera cuando llegan a normalizarse las concentraciones de T3 en el correspondiente tejido. Al contrario, la actividad del enzima 5'D-I disminuye en el hígado y pulmón de los animales infundidos con placebo, y va aumentando en los animales infundidos con T4 o T3 a medida que aumentan las concentraciones de T3 sérica. En el caso del hígado no hay diferencias entre los animales que alcanzan una determinada concentración de T3 sérica, bien por infusión de T4 o por infusión de T3. En el caso del pulmón, parece más eficaz la infusión de T4. Los resultados demuestran no sólo que los diferentes enzimas desyodantes se regulan de forma distinta por hormonas tiroideas, sino que la regulación de un mismo enzima por T4 y/o T3 es específica para cada tejido.

Efectos del "síndrome de T3 baja" inducido por una enfermedad no tiroidea (diabetes mellitus) en la madre sobre el estado tiroideo fetal.

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

Se ha inducido diabetes mellitus en ratas preñadas de 7 días, empleando estreptozotocina, para tener un modelo experimental de los efectos de una enfermedad materna no tiroidea sobre el estado tiroideo de los fetos. Se incluyeron también 3 grupos de ratas diabéticas tratadas diariamente con insulina (0.5, 1.0 y 1.5 U, respectivamente), un grupo infundido con dosis fisiológicas de T4, y un grupo de ratas controles que no recibieron estreptozotocina. En las ratas preñadas diabéticas se encontraron los cambios del metabolismo de hormonas tiroideas, característicos del "síndrome de T3 baja", incluyendo una disminución muy marcada de la T4 circulante. Estos cambios se evitaron con el tratamiento con insulina, pero sólo parcialmente con la infusión de T4. Los fetos de las madres diabéticas estaban muy afectados en su desarrollo, y sus tejidos estaban claramente deficientes en T4 y T3: la cantidad total de T4 y T3 extratiroidea en los fetos era un tercio de la encontrada en fetos normales. La concentración de T3 en el cerebro fetal estaba muy disminuída. Algunos, pero no todos, los cambios observados en los fetos se evitaron cuando las madres se trataron con insulina, pero no cuando se normalizaron sus concentraciones de T4 por infusión de esta hormona. En tal caso, la T3 cerebral seguía siendo baja.

Estos resultados indican que en el caso de hipotiroxinemia materna debida a una enfermedad no tiroidea, la normalización de las concentraciones circulantes de T4 mediante administración de esta hormona no previenen el posible daño cerebral del feto, sino que hay que corregir la causa patológica que ha dado lugar al "síndrome de T3 baja".

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)

Los flavonoides son componentes normales y abundantes en la dieta humana. 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. Así, aunque no se observaron cambios importantes en las concentraciones de T3 en los tejidos de las madres, se encontraron disminuciones muy importantes en los tejidos fetales, en modo especial en el cerebro. Esto puede deberse en parte al hecho que el flavonoide sintético atraviesa la placenta y se acumula en el feto, donde su velocidad de metabolización es mucho más lenta que en la madre. Se acumula así en el cerebro fetal, pudiendo dar lugar a una inhibición de la formación de T3 a partir de T4 y, por tanto, a retrasos en fases del desarrollo cerebral que requieren T3. Caso de que los flavonoides naturales se comporten como el flavonoide estudiado, podrían tener efectos nocivos sobre el cerebro del feto, sin que se observaran cambios en el estado tiroideo de las madres. Estos estudios se han realizado en colaboración con los grupos del Prof. D. van der Heide (Universidad de Wageningen, Países Bajos) y Prof. Dr. J. Köhrle (Universidad de Wurzburg, Alemania), Proyecto ERB SC1*CT-92-0831 de la CE.

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

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

La administración, a los 10 días de gestación, de una sola dosis del herbicida nitrofenil (2-4-diclorofenil-p-nitrofenil eter) a ratas se usa para obtener un modelo experimental de la hipoplasia pulmonar congénita. En varias publicaciones se había propuesto que esto podría ser

consecuencia de una interferencia en el metabolismo de las hormonas tiroideas, tan importante para la maduración pulmonar, tanto en el hombre como la rata. Asimismo, otros autores han encontrado que la administración de TRH y glucocorticoides a la rata preñada tratada con nitrofené contrarrestaba los efectos de este herbicida sobre la maduración pulmonar. Se está investigando el mecanismo por el cual esto ocurre. Una de las primeras posibilidades a testar es que la administración de TRH a la madre aumenta las concentraciones de hormonas tiroideas asequibles al feto, contrarrestando con ello la disminución de las concentraciones de hormonas tiroideas en el pulmón fetal. Se está testando esta hipótesis, midiendo concentraciones de T4 y T3 en plasma y tejidos maternos y fetales a distintas edades gestacionales, en ratas normales y las tratadas con nitrofené, con y sin tratamiento con TRH sólo, glucocorticoides sólo, o ambos.

Deficiencia de yodo en España

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

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

Se ha completado un estudio sobre la situación de la nutrición en yodo, medida por el yoduro urinario, y la prevalencia de bocio en la población escolar de la Comunidad de Madrid (CAM), por encargo de la Consejería de Salud. 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, en su conjunto, hay deficiencia de yodo, si bien de grado moderado (Grado I). En las diferentes zonas en las que ha subdividido la CAM por criterios geográficos, se ha encontrado que tanto la deficiencia de yodo como la prevalencia de bocio pueden variar, siendo la más afectada la zona suroeste de la CAM. En cada una de las zonas se ven más afectadas las niñas que los niños. En las niñas, la prevalencia de bocio va aumentando significativamente al llegar a la adolescencia, llegando casi al 18 %, cifra bastante superior al 5 %, límite a partir del cual se considera que hay deficiencia de yodo leve, acercándose al 20%, cifra por encima de la cual se considera que la deficiencia es moderada (Grado II). Este deterioro de la nutrición en yodo en las adolescentes cercanas ya a la edad fértil, resultó preocupante, ya que los defectos neurológicos por deficiencia de yodo se producen en el feto. Por ello se ha extendido el estudio a unas 400 mujeres embarazadas de la CAM, comprobándose que la mayoría de ellas no ingieren la cantidad de yodo recomendada durante la gestación y la lactancia. En ellas la deficiencia es muy superior a lo que se hubiera esperado de los resultados obtenidos en escolares, ya que la mitad de ellas ingieren *menos de la mitad* de la cantidad recomendada.

Los tejidos del embrión humano están expuestos a las mismas concentraciones de tiroxina "libre" que los tejidos adultos.

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

Habíamos demostrado la presencia de T4 en el líquido celómico que baña al embrión humano durante el primer trimestre de gestación, muy anterior al comienzo de la función tiroidea del feto. Para ello se usó un radioinmunoanálisis muy específico. Ahora se ha confirmado su identidad con la T4 por HPLC. Las concentraciones totales están relacionadas con los niveles séricos de T4 en la circulación materna, pero son mucho más bajas, en 2 o 3 órdenes de magnitud, en el líquido celómico y, aún más, en el amniótico. Son mucho más bajas que en la circulación materna. También lo son las concentraciones de proteínas que ligan las hormonas tiroideas, por lo que resultaba muy interesante determinar el porcentaje de T4 en forma "libre", no ligada a proteínas. Se considera que es esta forma "libre" de la T4 la que puede entrar en las células y dar lugar a la formación de la forma hormonal activa, la tri-yodo-tironina (T3). Se encontró, por diferentes métodos analíticos, que las concentraciones de T4 "libre" en el líquido celómico y en el amniótico son muy parecidas a las circulantes en la madre. Ambos líquidos están en contacto directo con el embrión, por lo que se deduce que las

concentraciones de T4 disponibles para los tejidos embrionarios no son mucho más bajas que en el adulto, sino del mismo orden de magnitud.

Estos resultados sugieren que las hormonas tiroideas pueden tener un papel en fases muy tempranas del 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. Indican, asimismo, la importancia de la función tiroidea materna durante el primer trimestre y la conveniencia de establecer programas masivos para la detección de alteraciones de la función tiroidea en embarazadas.

Deficiencia de yodo en niños prematuros

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

En años anteriores se había 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 ha puesto de manifiesto que los neonatos prematuros tienen concentraciones circulantes de T4 "libre" que son muy inferiores a las que les correspondería tener fisiológicamente, o sea, de seguir desarrollándose *in utero*. Asimismo, también lo son las concentraciones circulantes de la hormona estimuladora del tiroides (TSH). Estos resultados demuestran que con el nacimiento prematuro se interrumpen importantes aportaciones maternas de T4 y de TRH placentario que protegen al feto de su inmadurez hipotálamo-hipófisis-tiroidea. Por tanto, tienen que hacer frente a los elevados requerimientos hormonales del organismo cuando su glándula tiroidea aún no ha madurado adecuadamente. Se impone emprender estudios sobre posibles tratamientos sustitutorios de los prematuros con hormonas tiroideas y TRH, ya que se ha demostrado que sus bajos niveles de T4 durante el período perinatal son causa de retraso mental y mayor riesgo de parálisis cerebral.

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)

Se han ido completando estudios iniciados anteriormente, encaminados a la obtención de un modelo experimental en rata que permita el estudio de los mecanismos etiopatogénicos de las lesiones del sistema nervioso central debidas a la carencia de yodo durante fases iniciales del desarrollo del cerebro. Se ha demostrado que para su obtención hay que alimentar a las futuras madres con dietas con un contenido muy bajo de yodo ($<0.1 \mu\text{g I/día}$) y mantenerlas en estado de deficiencia grave durante la preñez y lactancia. Se consigue así que gran parte de su prole sufre lesiones neurológicas (que se manifiestan por convulsiones audiogénicas) que no se corrigen ya aunque después del destete se les suministre una dieta con un contenido normal en yodo y se corrijan con ello todas sus alteraciones de función tiroidea.

Con este protocolo se han podido demostrar alteraciones morfológicas del hipocampo en fetos, durante un período de desarrollo cerebral equivalente al del feto humano al principio del segundo trimestre, período en el que se producen las lesiones neurológicas irreversibles del cretino neurológico. Los datos apoyan fuertemente la idea que el cerebro del feto de rata necesita hormonas tiroideas en concentraciones adecuadas mucho antes de lo que proponían otros investigadores.

Estudios en ratones mutantes nulos del gen del receptor nuclear β de hormona tiroidea (TR β knock-out mice)

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

Los ratones knock-out TR β 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. Se ha encontrado que en los ratones homocigotos aumenta considerablemente la producción y secreción de T4, por lo que sus concentraciones aumentan en todos los estudiados (plasma, hígado, pulmón, riñón, corazón, músculo, corteza cerebral, cerebelo, tejido grasa pardo, tejido grasa blanco, etc. En cambio, las concentraciones de T3 no están elevadas, siendo normales en la mayoría de los tejidos. La actividad de la desyodasa hepática 5'D-I está muy disminuída, a pesar de las concentraciones normales de T3, lo que indicaría un estado de hipotiroidismo, a pesar de las concentraciones normales de T3 en dicho tejido. La TSH circulante está elevada y la GH hipofisaria está disminuída; ambos hallazgos también indicarían un estado de hipotiroidismo de la hipófisis. Esto era previsible, considerando que en los homocigotos se han anulado los receptores TR β . No es fácil comprender que haya aumentado la secreción tiroidea de T4 sin hacerlo la de T3, a no ser que la desyodasa 5'D-I del tiroides está disminuída, al igual que la hepática. Este punto sigue en estudio, así como a posibilidad, o no, de llegar a un estado de eutiroidismo tisular mediante la infusión de dosis suprefisiológicas de T3. De ser así, se concluiría que la falta de receptores TR β puede llegar a compensarse por unión de la T3 a otros receptores, o por otros mecanismos aún no identificados.

Publicaciones

- Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1996). Iodine deficiency and the transplacental passage of thyroid hormones. *Topical Endocrinology* (ISSN 1356-7314), Chapterhouse Codex, Hampshire UK, 2, 3-6.
- Serna, J., González-Guerrero, P., Scanes, C., Prati, M., Morreale de Escobar, G., dePablo, F. (1996). Differential and tissue-specific regulation of proinsulin and IGF-I genes and levels of thyroid hormones in growth-retarded embryos. *Growth Regulation* 6, 73-82.
- Escobar-Morreale, H., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J., Morreale de Escobar, G. (1996). Only combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 137, 2490-2502
- Morreale de Escobar, G., Pedraza, P. E., Escobar del Rey, F., Obregón, M. J. (1996). Thyroidal and extrathyroidal adaptation to graded degrees of iodine deficiency: An experimental model for the study of neurological iodine deficiency disorders (IDD). En: Braverman LE, Köhrle J, Eber O, Langsteger W (eds) *Thyroid and Trace Elements*, Blackwell Scientific Publications, Viena, pp. 113-126.
- Obregón, M.J., Calvo, R., Hernández, A., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1996). Regulation of uncoupling protein (UCP) mRNA and 5'Deiodinase (5'D) activity by thyroid hormones in fetal brown adipose tissue. *Endocrinology* 137, 4721-4729.
- Pedraza, P., Calvo, R., Obregón, M.J., Asunción, M., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1996). Displacement of T4 from transthyretin by the synthetic flavonoid EMD 21388 results in increased production of T3 from T4 in rat dams and fetuses. *Endocrinology* 137, 4902-4914.
- Calvo, R.M., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J. (1997). Maternal non-thyroidal illness and fetal thyroid hormone status, as studied in the streptozotocin-induced diabetes mellitus rat model. *Endocrinology* 138, 1159-1169.

- Calvo, R.M., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J. (1997). Maternal diabetes mellitus, a rat model for non-thyroidal illness: correction of hypothyroxinemia with thyroxine treatment does not improve fetal thyroid hormone status. *Thyroid* 7, 79-87.
- Palha, J. A., Hays, M. T., Morreale de Escobar, G., Episkopou, V., Gottesman, M., Saraiva, M. J. M. (1997). Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in a transthyretin null mouse strain. *Am. J. Physiol.* 272, E485-E493.
- Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1997). Hormonas tiroideas durante el desarrollo fetal: comienzo de la función tiroidea y transferencia materno-fetal. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*. M. Pombo Arias (ed), Ediciones Diaz de Santos, Madrid, 125-152
- Schröder-van der Elst, J. P., Van der Heide, D., Rokos, H., Köhrle, J., Morreale de Escobar, G. (1997). Different tissue distribution, elimination, and kinetics of thyroxine and its conformational analog, the synthetic flavonoid EMD 49209 in the rat. *Endocrinology* 138, 79-84
- Martínez-Galán, J. R., Pedraza, P., Santacana, M., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Ruiz-Marcos, A. (1977) Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus: A model of neurological cretinism. *J. Clin. Invest.* 99, 2701-2709.
- Ares, S., Escobar-Morreale, H. F., Quero, J., Durán, S., Presas, M. J., Herruzo, R., Morreale de Escobar, G. (1997). Neonatal hypothyroxinemia: Effects of iodine intake and premature birth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1704-1712.
- Martínez-Galán, J. R., Pedraza, P., Santacana, M., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Ruiz-Marcos, A. (1997). Myelin basic protein immunoreactivity in the internal capsule of neonates from rats on a low iodine intake or on methylmercaptoimidazol. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 101, 249-256.
- Tovar, J. A., Diez-Pardo, J. A., Alfonso, L. F., Arnaiz, A., Alvarez, F. J., Vasilis, A., Morreale de Escobar, G. (1977). Thyroid hormones in the pathogenesis of lung hypoplasia and immaturity induced in fetal rats by prenatal exposure to Nitrofen. *J. Pediatr. Surg.* 32, 1295-1297.
- Perán, S., Garriga, M. J., Morreale de Escobar, G., Asunción, M., Perán M. (1997). Increase in Plasma TSH levels in hypothyroid patients under treatment due to a defect in the commercial preparation. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 82, 3192-3195.
- Escobar-Morreale, G., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1997). Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138, 4485-4488.
- Morreale de Escobar, G., Obregón, M. J., Calvo, R., Pedraza, P. E., Escobar del Rey, F. (1997). Iodine deficiency, the hidden scourge: The rat model of human neurological cretinism. *Neuroendocrinology- Thyroid hormone and brain maturation*, C.H. Hendrich (ed.) Research Signpost, Trivandrum, India pp. 55-70

Tesis Doctorales

Pablo Enrique Pedraza Torres

“Disfunciones por deficiencia de yodo: Modelo experimental en rata”. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. 1997. Directora: Gabriela Morreale. Calificación: Apto “cum laude”

Palabras claves

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

Biología de los genes *erbA*, que codifican por los receptores de la hormona tiroidea, y de otros receptores hormonales nucleares

Investigador Principal:	Muñoz, Alberto, Investigador Científico
Investigadores Contratados:	Caelles, Carme (hasta septiembre 1.997)
Investigadores Asociados:	Jiménez, Benilde Profesor Asociado UAM (desde enero 1.997)
Becarios Postdoctorales:	García, Luis F. (desde enero 1.997) Llanos, Susana (desde diciembre 1.996)
Becarios predoctorales:	Alvarez, Manuel García, Luis F. (hasta enero 1.997) González, José M. Llanos, Susana (hasta diciembre 1.996) Cuadrado, Ana García, Hector (desde octubre 1.997) Navarro, Cristina (desde septiembre 1.997)
Personal de apoyo:	González, Margarita

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

(S. Llanos, C. Caelles y A. Muñoz, en colaboración con el Dr. H. Riese del Centro Nacional de Biotecnología)

Los genes *c-erbA* y *v-erbA* 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 embrionario de ratón. 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 la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo B (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. Actualmente estamos investigando cuál(es) de la mutación(es) presente(s) en *v-erbA* es responsable de estos efectos, y si las células B3.1 que expresan son tumorigénicas en animales atímicos. Con objeto de completar el estudio, se ha comenzado una línea de trabajo dirigida a generar ratones transgénicos que expresen *v-erbA* específicamente en astrocitos. Además, en paralelo estamos analizando los efectos de *c-erbA* sobre las células B3.1.

Efecto de los genes *erbA* sobre la diferenciación neuronal

(A. Cuadrado y A. Muñoz)

A la vista de los sus efectos sobre la diferenciación de las células PC12 de feocromocitoma (Muñoz et al., J. Cell Biol., 121, 423-438, 1993) y con objeto de analizar los efectos de *erbA* y de la hormona tiroidea sobre la diferenciación de neuronas del sistema nervioso central, utilizando distintos vectores retrovirales hemos llevado a cabo la expresión en una línea celular de neuroblastos de cerebro embrional de rata (células P) tanto de los genes *c-erbA* y *v-erbA* como de *trkA* y *trkB*, que codifican respectivamente los receptores de alta

afinidad de las neurotrofinas NGF (“Nerve Growth factor”) y BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor”). Actualmente estamos caracterizando los efectos biológicos (supervivencia, diferenciación en respuesta a sus ligandos específicos) individuales y combinados de los genes introducidos, así como tratando de identificar genes regulados mediante PCR diferencial.

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 Depto. 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, la PGD2 sintetasa actúa como un transportador de lípidos, incluidos retinoides, 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, así como su regulación por otras hormonas.

Búsqueda de genes regulados por hormonas tiroideas en cerebro

(M. Alvarez-Dolado, C. Navarro y A. Muñoz, en colaboración con el Dr. J. Bernal del IIB)

A la vista de los efectos anteriormente observados sobre el gen de adhesión celular N-CAM y de las alteraciones existentes en el hipotiroidismo, hemos estudiado la expresión del gen que codifica la proteína de matriz extracelular tenascina-C, implicada en adhesión y migración celular y neuritogénesis, en el cerebro hipotiroideo. Nuestros resultados indican que la hormona tiroidea regula de modo complejo, dependiente de región, la expresión de tenascina-C durante el desarrollo cerebral en la rata, así como en células gliales en cultivo. Por otra parte, mediante PCR diferencial ("differential display" PCR) utilizando amplímeros degenerados hemos aislado un clon de cDNA denominado S2 que corresponde a un gen de amplia expresión cerebral que es regulado por hormona tiroidea específicamente en el estriado, según se ha comprobado por técnica de Northern e hibridación *in situ*. El clon S2 tiene homología con varias secuencias EST presentes en diversas bases de datos, aunque aún no disponemos de su cDNA completo.

Estudio del mecanismo molecular del antagonismo entre receptores hormonales nucleares y el factor transcripcional AP-1

(C. Caelles, J. M. González-Sancho y A. Muñoz)

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. AP-1 está compuesto por dímeros de proteínas de las familias Jun y Fos. Dada la importancia de la actividad AP-1 en la regulación de la expresión de genes cruciales para la proliferación y fenotipo celular, y su rápida inducción en respuesta a factores de crecimiento y situaciones de estrés celular (radiación ultravioleta, citoquinas proinflamatorias), esta interacción puede ser clave para el control de procesos tan importantes como la transformación maligna o la respuesta inmune, y explicaría en gran medida las acciones farmacológicas de glucocorticoides y retinoides. Los datos sobre el mecanismo de esta interacción son escasos y muchas veces contradictorios. Nuestros resultados demuestran que los receptores hormonales nucleares (GR, ErbA, RAR y vitDR) una vez unidos

a su ligando específico causan la inhibición de la ruta de señalización intracelular de la JNK (“c-Jun N-terminal Kinase”) que conduce a la activación por fosforilación de c-Jun, componente principal del factor AP-1. De este modo, las hormonas con receptores nucleares inhiben AP-1 y ejercen, al menos en parte, sus efectos como antiproliferativos, inmunosupresores y antiinflamatorios.

Mecanismo de acción de agentes antiangiogénicos

(B. Jiménez, H. García y A. Muñoz, en colaboración con la Dra. Noel Bouck de la Northwestern University de Chicago)

Recientemente hemos iniciado el estudio del mecanismo por el que la proteína de matriz extracelular trombospondina-1 (TSP-1) y las hormonas glucocorticoides y retinoides inhiben la acción angiogénica del VEGF (“Vascular Endothelial Growth Factor”) y el bFGF (“basic Fibroblast Growth factor”). Como sistema biológico empleamos células microvasculares primarias humanas y bovinas, así como líneas establecidas de origen humano y de ratón. Estamos estudiando las vías de señalización inducidas por VEGF y bFGF, así como su inhibición por TSP-1 y los receptores hormonales activados.

Publicaciones

- Llanos, S., Iglesias, T., Riese, H.H., Garrido, T., Caelles, C. and Muñoz, A. (1996). v-erbA oncogene induces invasiveness and anchorage-independent growth in cultured glial cells by mechanisms involving PDGF. *Cell Growth & Differentiation* 7, 373-382.
- Iglesias, T. Caubín, J., Stunnenberg, H.G., Zaballos, A., Bernal, J. and Muñoz, A. (1996). Thyroid hormone-dependent transcriptional repression of neural cell adhesion molecule during brain maturation. *EMBO J.* 15, 4307-4316.
- García-Fernández, L.F., Rausell, E., Fairén, A., Urade, Y., Hyaishi, O., Bernal, J. and Muñoz, A. (1996). Rat brain prostaglandin D2 synthase is regulated by thyroid hormone in vivo. *Prostaglandins* 51, 302.
- López-Barahona, M., Iglesias, T., García-Higuera, I., Mayor Jr., F., Zaballos, A., Bernal, J. and Muñoz, A. (1996). Posttranscriptional induction of β 1-adrenergic receptor by retinoic acid, but not triiodothyronine, in C6 glioma cells expressing thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* 135, 709-715.
- García-Fernández, L.F., Rausell, E., Urade, Y., Hayaishi, O., Bernal, J. and Muñoz, A. (1997). Hypothyroidism Alters the Expression of Prostaglandin D2 Synthase/b trace in Specific Areas of the Developing Rat Brain. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1566-1573.
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer. genes y nuevas terapias.* Editorial Hélice, Madrid.
- Muñoz, A. and Bernal, J. (1997). Biology of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 433-445.
- Caelles, C., González-Sancho, J.M. and Muñoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & Dev.* 11, 3351-3364.

Tesis Doctorales

Luis Francisco García Fernández

"Regulación del gen de la prostaglandina D2 sintetasa de cerebro de rata por hormona tiroidea". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Alberto Muñoz. Calificación: Apto "cum laude".

Susana Llanos Girón

"Efecto de los genes c-erbA y v-erbA en células gliales B3.1". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Alberto Muñoz. Calificación: Apto "cum laude".

Manuel Alvarez Dolado

"Búsqueda y caracterización de genes regulados por hormona tiroidea en el cerebro de la rata". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Director: Alberto Muñoz. Calificación: Apto "cum laude".

Palabras clave

erbA, hormona tiroidea, receptores nucleares, glucocorticoides, retinoides, factor AP-1, PDGF, tenascina, prostaglandina D2 sintasa, cerebro, glía, diferenciación neuronal

Regulación de la proliferación y diferenciación de adipocitos marrones. Regulación de las desiodasas por hormonas tiroideas

Investigador principal:	Obregón, M ^a Jesús, Investigador Científico
Investigadores contratados:	Schröder-van der Elst, Janny (desde septiembre 1996) Calvo, Rosa Maria (desde agosto 1997)
Becarios predoctorales:	García, Bibian Martín, Eva Martínez de Mena, Raquel Medina, Gema (desde Enero 1997)
Investigadores asociados:	Morreale, Gabriella, Profesor de Investigación <i>ad honorem</i> Escobar del Rey, Francisco, Profesor de Investigación jubilado
Personal de apoyo:	Hernández, Arturo (hasta octubre 1996)

Proliferación de adipocitos marrones en cultivo primario.

(Bibian García, Maria Jesús Obregón)

Hemos estudiado los mitógenos y hormonas que conducen a la proliferación de los adipocitos marrones de rata en cultivo primario, ya que es uno de los mecanismos de activación del tejido adiposo marrón (aumento del número de células). Se utilizan células "precursoras" obtenidas del tejido adiposo marrón (BAT) de rata, en estado quiescente, estudiando los efectos de diversos factores de crecimiento, mitógenos y hormonas.

Varios factores de crecimiento: EGF, PDGF y FGFs estimulan la proliferación de los precursores de adipocitos y la vasopresina potencia dichas acciones mitogénicas. La estimulación adrenérgica con norepinefrina (NE) potencia los efectos mitogénicos del suero, factores de crecimiento y vasopresina. Se han estudiado los mecanismos de acción de la NE (via PKA y PKC). Aunque el cAMP es la vía más importante de señalización de la NE, éste no reproduce los efectos de la NE sobre proliferación. Sin embargo la PKC parece estar involucrada y se han estudiado las isoformas de PKC que participan en el proceso de proliferación y el sinergismo entre ambas rutas de estimulación adrenérgica.

Se han testado otras vías involucradas en la proliferación: ácido araquidónico y otros ácidos grasos, y factores producidos por células endoteliales, como la endotelina-1.

Se ha verificado que las células obtenidas tras la proliferación con estos mitógenos son auténticos adipocitos marrones, es decir, expresan UCP, y cómo los mitógenos usados modulan la expresión de UCP (inhibiendo ó aumentando el mRNA de UCP).

Regulación del gen de la UCP en adipocitos marrones por noradrenalina, hormonas tiroideas, ácido retinoico, insulina y glucocorticoides.

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

Se cree que el tejido adiposo marrón (BAT) es su forma activa regula el gasto energético y por ello podría ser importante en la etiología de la obesidad. Dentro de los mecanismos de activación del BAT, el principal es la inducción del mRNA de UCP, marcador específico del BAT. Hemos estudiado el efecto de las hormonas tiroideas sobre la activación adrenérgica de la UCP, usando cultivos primarios de adipocitos marrones, que proliferan a partir de células precursoras, diferenciándose a adipocitos maduros. Este apartado es abordado desde diversos ángulos por varias personas del grupo.

Por estudios anteriores (A.H.) sabemos que la expresión del mRNA de UCP aumenta con

norepinefrina (NE) solamente durante la fase de diferenciación (células confluentes) y que la T3 es necesaria y potencia enormemente los efectos adrenérgicos de la NE sobre el mRNA de UCP. Estos efectos son dependientes de la dosis y del tiempo de preexposición a T3 y requieren síntesis de proteínas. Además, la T3 estabiliza la vida media de los mRNA transcritos. También se ha estudiado el efecto del Triac (A.H., G.M.), un metabolito de la T3, que tiene mayor actividad termogénica que la T3 sobre la UCP. También estamos estudiando la modulación de dicha activación adrenérgica por insulina y T3 y por glucocorticoides (R.M.).

Además estamos estudiando la activación del gen de la UCP a nivel de promotor (E.M., R.C.). Se ha clonado el promotor de la UCP, aislandose distintas porciones del extremo 5' terminal hasta -6.0 kb. La regulación del gen de la UCP de rata se estudia en transfecciones transitorias usando cultivos primarios de adipocitos marrones de rata. Se está estudiando la regulación del promotor por norepinefrina, T3, retinoico y glucocorticoides y cómo afecta la depleción de insulina a estos efectores. También se está estudiando la unión de receptores nucleares (TR, RXR, PPAR) a proteínas nucleares de éstas células, usando ensayos de retardo en gel, así como sus niveles de expresión.

En este año se ha clonado una familia de proteínas homólogas a la UCP (UCP-2 y UCP-3), con expresión en distintos tejidos, que parecen estar involucradas en el control de la termogénesis a nivel del músculo esquelético y otros órganos. Hemos iniciado su clonaje y el estudio de su regulación (R.C., G.M.).

Regulación de las 5' Desiodasa II (5'D-II) y 5' Desiodasa (5D-III) en adipocitos marrones en cultivo

(Arturo Hernández, Raquel Martínez, María Jesús Obregón)

La T3 necesaria para la activación del BAT es producida en el adipocito marrón por la 5' Desiodasa tipo II (5'D-II). Hemos estudiado la regulación de dicha actividad 5'D-II en los cultivos arriba descritos. La actividad 5'D-II se estimula por NE, vía receptores β -adrenérgicos. La 5'D-II se inhibe por T4, mientras que la T3 potencia enormemente la activación adrenérgica de la 5'D-II y ésta acción de la T3 es similar a la inducida sobre el mRNA de UCP. El efecto de la T3 sobre la NE es más importante en células totalmente diferenciadas y no parece estar mediado por la ruta de la PKA o por aumentos del cAMP, aunque se reproduce usando agonistas adrenérgicos β_3 .

A partir de observaciones de una muy rápida metabolización de la T3 en nuestros cultivos primarios y de la medida de bajas concentraciones celulares de T3, comenzamos a investigar las rutas de degradación de la T3, concretamente su degradación por desiodación en el anillo interno (5D-III). Hemos medido altas actividades 5D-III en los cultivos, actividades que son inducibles por el suero usado en los cultivos o por los factores de crecimiento presentes en él. La actividad 5D-III también se induce por T3, T4, ácido retinoico y por NE, y las acciones de las hormonas tiroideas y NE son sinérgicas. Las inducciones obtenidas con éstas sustancias son más bajas que al estimular con factores de crecimiento. También se está realizando un estudio donde se analiza la correlación entre actividad mitogénica y proliferación y 5D-III. De hecho la actividad 5D-III es alta en etapas tempranas del desarrollo (rana) o en tejidos fetales.

Ambas enzimas (5'D-II, 5D-III) han sido clonadas durante 1995 lo que nos ha permitido analizar si los efectos observados a nivel de actividad son debidos a aumentos en la actividad transcripcional. Los resultados obtenidos usando inhibidores de la síntesis de proteínas así lo sugerían. Efectivamente, los efectos del suero, factores de crecimiento, hormonas tiroideas y retinoico sobre la 5D-III son a nivel de inducción de la transcripción. También estamos analizando los efectos de la NE y T3 sobre el mRNA de la 5'D-II. En paralelo, el grupo del Dr. J. Bernal ha abordado el estudio de la distribución de la 5'D-II en cerebros neonatales por hibridación *in situ*. Dicho estudio demuestra la adscripción de la 5'D-II a astrocitos y tanicitos.

Regulación de las actividades desiodasas en tejidos fetales de rata

(Rosa Calvo, María Jesús Obregón, Arturo Hernández, Janny Schröder-van der Elst 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 desiodasas en tejidos fetales y adultos de rata. Se han explorado principalmente situaciones de deficiencia de yodo. 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 desiodasas 5'D y 5D por hormonas tiroideas o insulina:

1. Efecto de la diabetes sobre el metabolismo tiroideo y las desiodasas en ratas gestantes y sus fetos. Efecto de la terapia sustitutiva con insulina y/o T4.

2. Efecto de la subnutrición sobre las desiodasas 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 desiodasas en hígado, cerebro, hipófisis y BAT.

4. Efecto de la deficiencia de yodo (grave ó leve) sobre las desiodasas de hígado, tiroides, cerebro, hipófisis, BAT, piel y otros tejidos. Estudios de varios genes regulados por hormonas tiroideas

5. Estudio de ratones transgénicos con depleción de receptores- β de T3 y anomalías provocadas por el transgen.

Publicaciones

- Escobar-Morreale, H., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J., Morreale de Escobar, G. (1996). Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 137, 2490-2502
- Hernández, A., Obregón, M.J. (1996). T3 potentiates the adrenergic stimulation of type II 5'-Deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol.* 271, E15-E23.
- Hernández, A., Obregón, M.J. (1996). Nuclear T3 receptors activity and mRNA expression in cultured rat brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 121, 37-46.
- Morreale de Escobar, G., Pedraza, P.E., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J. (1996). Thyroidal and extrathyroidal adaptation to graded degrees of iodine deficiency: An experimental rat model for the study of neurologic iodine deficiency disorders (IDD). In: Braverman, L.E., Köhrle, J., Eber, O., Langsteger, W. (eds) "Thyroid and Trace Elements", Blackwell Scientific Publications, Viena, 113-126.
- Obregón, M.J., Calvo, R., Hernández, A., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1996). Regulation of uncoupling protein (UCP) mRNA and 5'Deiodinase (5'D) activity by thyroid hormones in fetal brown adipose tissue. *Endocrinology* 137, 4721-4729.
- Obregón, M.J., Cannon, B., Nedergaard, J. (1996). Postnatal selective suppression of lipoprotein lipase gene expression in brown adipose tissue (relative to the expression of the gene for the uncoupling protein (UCP)) is not due to adrenergic insensitivity: a possible specific inhibitory effect of colostrum. *Biochem J.* 314, 261-267.
- Pedraza, P., Calvo, R., Obregón, M.J., Asunción, M., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1996). Displacement of T4 from transthyretin by the synthetic flavonoid EMD 21388 results in increased production of T3 from T4 in rat dams and fetuses. *Endocrinology* 137, 4902-4914.
- Solé, E., Calvo, R., Obregón, M.J., Meseguer, A. (1996). Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol. Cell. Endocrinol.* 119, 147-159.
- Calvo, R.M., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J. (1997).

Maternal non-thyroidal illness and fetal thyroid hormone status, as studied in the streptozotocin-induced diabetes mellitus rat model. *Endocrinology* 138, 1159-1169.

Calvo, R.M., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., Obregón, M.J. (1997). Maternal diabetes mellitus, a rat model for non-thyroidal illness: correction of hypothyroxinemia with thyroxine treatment does not improve fetal thyroid hormone status. *Thyroid* 7, 79-87.

Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Hernández, A., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1997). Regulation of iodothyronine deiodinase activity as studied in thyroidectomized rats infused with thyroxine or triiodothyronine. *Endocrinology* 138, 2559-2568.

García, B., Obregón, M.J. (1997). Norepinephrine potentiates the mitogenic effect of growth factors in quiescent brown preadipocytes: Relationship with uncoupling protein messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 138, 4227-4233.

Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., St.Germain, D., Bernal, J. (1997). Type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10391-10396.

Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Calvo, R., Pedraza, P., Escobar del Rey, F. (1997). Iodine deficiency, the hidden scourge: The rat model of human neurological cretinism. In: "Recent Research developments in Neuroendocrinology: Thyroid hormone and brain maturation", Hendrich, C.H.(ed). Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 55-70.

Obregón, M.J. (1997). Tejido adiposo: Aspectos fisiológicos y su repercusión clínica. In: "Obesidad. Presente y futuro". Moreno, B., Monereo, S., Gargallo, M. (eds)., Aula Médica, Madrid, pp 11-23.

Tesis Doctorales

Bibian García García

"Regulación de la proliferación y diferenciación en adipocitos marrones de rata, en cultivo, por factores de crecimiento y hormonas". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Directora: Maria Jesús Obregón. Calificación: Apto "cum laude"

Palabras claves

T4, T3, UCP, desiodasas, 5'D, 5D, adipocitos marrones

Regulación de la transcripción: Análisis de los mecanismos moleculares implicados en el control hormonal y en la expresión de genes específicos de tejido.

Investigador Principal :	Santisteban Pilar, Colaborador Científico.
Investigador Contratado:	Velasco, Juan Angel
Investigador Visitante:	Loaiza, Andrea I. Depto. de Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. (Enero 1996-Marzo 1997)
Becarios pre-doctorales :	Ortiz, Lourdes Barroso, Isabel Medina, Diego L. Moreno, José Carlos Losada, Alejandro Dilla, Tatiana (desde Noviembre 1997) De la Vieja, Antonio (hasta Diciembre 1996) Ros, Purificación (hasta Mayo 1996)
Personal de apoyo :	Navarrete, Mercedes Fernández, Estefania (Noviembre 1996-Enero 1997) Seisdedos, M ^a Teresa (Desde Enero 1997)
Colaboraciones:	Di Lauro, Roberto (Stazione Zoologica A. Dohrn, Nápoles) Mato, Eugenia (Hospital San Pablo, Barcelona) Tobar, Juan (Hospital La Paz, Madrid)

Factores de transcripción específicos de tejido y ubicuos en el control de la transcripción basal y dependiente de hormonas en células tiroideas.

(Lourdes Ortiz, Maria Teresa Seisdedos y Pilar Santisteban)

Los genes Tg y TPO están regulados transcripcionalmente por la hormona hipofisaria tirotrópica (TSH), vía AMPc, y por insulina e IGF-I. En los promotores de ambos genes no existen elementos consenso para AMPc (CRE) o insulina (IRE). Con nuestro trabajo se ha identificado al factor de transcripción *fork-head* TTF-2 como el principal responsable de la regulación hormonal en tiroides, y a su sitio de unión en el DNA como un elemento de respuesta a hormonas. Sin embargo para que TTF-2 medie la respuesta hormonal, en el promotor de TPO, necesita localizarse en una posición precisa próxima a un factor de transcripción ubicuo. Hemos identificado ese factor como un miembro de la familia de factores constitutivos CTF/NF1, siendo su participación decisiva, ya que hemos demostrado mediante ensayos de interacción proteína-proteína que el control hormonal de la transcripción del gen TPO depende de la interacción estereoespecífica entre el factor TTF-2 y factores CTF/NF-1.

Vías de transducción de señales implicadas en el control hormonal de la función tiroidea.

(Diego Medina, Juan Angel Velasco y Pilar Santisteban)

Aunque hemos definido al factor TTF-2 como el principal mediador de la regulación hormonal tiroidea, el factor *homeo-box* TTF-1 también juega un papel importante tanto en la regulación basal como en la dependiente de hormonas. Hemos demostrado que para que ese factor sea activo transcripcionalmente tiene que estar fosforilado. La fosforilación, que sólo tiene lugar en serinas, no afecta su unión al DNA pero si su capacidad transactivadora. Estamos centrados en el estudio de las vías de transducción de señales y en la identificación de las quinasas implicadas en la fosforilación de TTF-1. Los primeros datos indican que TTF-1 se

fosforila en respuesta a AMPc/PKA, habiendo demostrado que la inhibición de la vía PKC aumenta a su vez dicha fosforilación. Nuestros datos más recientes conducen a la hipótesis de que en la célula tiroidea existe una comunicación intracelular entre ambas vías de señalización, que resultaría en la activación de una quinasa específica de tejido tiroideo, la cual sería la responsable final de la fosforilación en el núcleo de TTF-1.

Regulación del ciclo celular en células parafoliculares tiroideas.

(Juan Angel Velasco, Diego Medina, Tatiana Dilla y Pilar Santisteban)

Durante el bienio 96-97 hemos iniciado una nueva línea de investigación tomando como modelo las células parafoliculares transformadas denominadas MTT. Hemos demostrado que estas células presentan una reorganización importante del locus que codifica para el gen supresor de tumores p53. Además datos recientes, señalan que estas células son deficientes para la expresión de p21^{WAF1/Cip1}. Estos datos suponen que dos de los principales reguladores del ciclo celular se encuentran alterados. La expresión exógena de p53, provocó una parada parcial del ciclo en G1. Esta parada, no dependiente de p21^{WAF1/Cip1}, supone una excepción al modelo más aceptado de regulación del ciclo celular. La generación de transfectados estables de p53 en la línea MTT está siendo la base de nuevos estudios en nuestro grupo.

Implicación de factores de transcripción específicos de tiroides en patología tiroidea humana : dishormonogénesis tiroidea e hipotiroidismo congénito.

(José Carlos Moreno y Pilar Santisteban)

Datos presentados en la memoria anterior habían demostrado niveles bajos de expresión del factor TTF-1 en un bocio congénito familiar con defecto de síntesis de Tg. Así mismo la generación, por diferentes grupos de trabajo, de ratones *knock-out* para TTF-1, TTF-2 y Pax-8 asocian la falta de expresión de estos genes con hipotiroidismo, principalmente agenesias y ectopias así como con otras alteraciones tiroideas. Por ello en colaboración con departamentos de Pediatría de diferentes Hospitales hemos comenzado un estudio de la participación de los anteriores factores de transcripción en hipotiroidismos de diferentes etiologías. De momento hemos recolectado sangre de familias con alguna de estas patologías y aislado el DNA. Los primeros resultados obtenidos han detectado mutaciones no descritas en el gen de TPO, en pacientes con dishormonogénesis tiroidea. Continuaremos este estudio con más muestras y con estudios funcionales del papel que las mutaciones encontradas ejercen en la célula tiroidea.

Control de la expresión de las proteínas surfactante de pulmon por los factores de transcripción TTF-1 y HNF-3 en un modelo de hernia diafrágmatica.

(Alejandro Losada, Juan Tovar y Pilar Santisteban)

El hecho de que el factor de transcripción *homeo-box* TTF-1 se haya detectado también en pulmón y sea junto con el factor *fork-head* HNF-3 los principales reguladores de la expresión de las proteínas surfactantes, nos ha llevado a estudiar el papel de ambos factores en el desarrollo de la hernia diafrágmatica. Esta enfermedad caracterizada por una atrofia del pulmón y una reducción de las proteínas surfactantes, se puede inducir en la rata en un modelo experimental bien establecido por el Dr. Tovar en el Servicio de Cirugía Infantil del Hospital La Paz. Estamos estudiando la expresión de TTF-1 y HNF-3 en pulmones de fetos de rata cuyas madres han sido tratadas con nitrofen, un herbicida capaz de producir hernia diafrágmatica cuando es inyectado a ratas gestantes. La administración de glucocorticoides, como dexametsona, y TRH reduce esta malformación; por tanto la regulación de los anteriores factores de transcripción por ambas hormonas es también motivo de nuestro estudio.

Factores de transcripción implicados en la regulación del gen del enzima málico por insulina (1) y por dioxinas (2)

(Isabel Barroso (1), Andrea I. Loaiza (2), Maria Teresa Seisdedos (2) y Pilar Santisteban (1, 2))

La expresión del gen del enzima málico citosólico (ME) está controlada hormonalmente. Datos presentados en memorias anteriores demostraban un papel de gran importancia a la insulina en el control de la transcripción de este gen. Sin embargo los elementos de respuesta a esta hormona no estaban caracterizados en el promotor de ME, ni eran conocidos los factores de transcripción que mediaban dicha respuesta. En una primera aproximación hemos definido un papel crucial para los factores de transcripción Sp-1 y Sp-3 en la transcripción del gen de ME. En ensayos de transfección transitoria, usando como modelo células de insecto *Sneider*, hemos demostrado que el factor Sp-1 coopera sinérgicamente con miembros de la familia de receptores nucleares (T3R, PPAR, RAR y RXR). Más recientemente hemos caracterizado, en células de hepatoma de rata H35, un elemento de respuesta a insulina en el que además de unirse factores de la familia Sp-1 también se une un factor de transcripción que hemos identificado como el factor de expresión temprana *erg-1* o *NFG-IA*.

La expresión del gen de ME está aumentada en ratas tratadas con hexaclorobenceno, un pesticida que actúa a través del receptor de dioxina e induce una cascada de señales que dan como resultado final un incremento de la transcripción del gen ME. Los factores de transcripción implicados en esa respuesta no están bien caracterizados aunque se han definido en muchos genes la existencia de elementos Xenobióticos (XRE). Hemos identificado uno de estos elementos en el promotor de ME y estamos estudiando su funcionalidad y los factores de transcripción que se unen en respuesta al hexaclorobenceno

Publicaciones

- Zannini, M., Acebrón, A., De Felice, M., Arnone, I., Martín-Pérez, J., Santisteban, P. and Di Lauro, R. (1996). Mapping and functional role of phosphorylation sites in the thyroid transcription factor 1 (TTF-1). *J. Biol. Chem.* 271, 2249-2254.
- Santisteban, P. (1996). Factores de transcripción específicos de tiroides. *Endocrinología* 43, 65-70
- Baggio, M. C., Medeiros-Neto, G., Osawa, Y., Nguyen, N.Y., Santisteban, P. Knobel, M. and Grollman, E.F. (1996). Amino acid composition of proteins extracted from endemic goiter glands. *Endocrine Pathology* 7, 137-143.
- Santisteban, P., Ortiz, L., Aza-Blanc, P., Rossi, D., & Acebrón, A. (1996). Function of thyroid-specific transcription factors in the hormonal control of gene expression, cellular proliferation and human thyroid pathologies. *Proceedings of the Workshop on Gene Expression*, pag 77-78. Edited by Commission of European Union Biotechnology.
- De la Vieja, A., Calero, M., Santisteban, P. and Lamas, L. (1997). A new sensitive and simple method for the identification and quantification of iodotyrosines and iodothyronines in proteins using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B* 688, 143-149.
- De la Vieja, A., Lamas, L. y Santisteban, P. (1997). Síntesis y secreción de hormonas tiroideas: I Control del tiroides, transporte de yoduro, TPO, iodación y acoplamiento. *Endocrinología* 44, 165-177
- De la Vieja, A., Lamas, L. y Santisteban, P. (1997). Síntesis y secreción de hormonas tiroideas: II Tiroglobulina. Secreción de las hormonas y transporte en el suero. *Endocrinología* 44, 178-187.

Ortiz, L., Zannini ME, Di Lauro, R. and Santisteban, P. (1997). Transcriptional Control of the Forkhead Thyroid Transcription Factor TTF-2 by Thyropropin, Insulin and IGF-I. *J. Biol. Chem.* 272, 23334-23339.

Velasco, J. A., Medina, D. L., Romero, J., Mato, M. E, and Santisteban, P. (1997). Introduction of p53 induces cell cycle arrest in p53-deficient human medullary-thyroid carcinoma cells. *Int.J.Cancer* 73, 449-455.

Mato, M. E., Santisteban, P., Chowen, J.A. Fornas, O., Bouwens, M. Puig Domingo, M. Argente, J. and Webb, S.M. (1997). Circannual somatostatin gene and somatostatin receptor gene expression in the early post-natal rat pineal gland. *Neuroendocrinology* 66, 368-374.

Ros, P. y Santisteban, P. (1997). El receptor de TSH en fisiología y patología tiroidea humana. *Endocrinología* 44, 369-379.

Tesis doctorales

Purificación Ros Pérez

"Estudio molecular del receptor de la hormona tirotrópica en patología tiroidea humana". , Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 1996. Directora: Pilar Santisteban. Calificación: "Apto cum laude".

Antonio de la Vieja.

"Importancia de los aminoácidos de tirosina y de la secuencia primaria de la tiroglobulina en la hormonogénesis tiroidea". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. 1996. Codirectores: Luis Lamas y Pilar Santisteban. Calificación: "Apto cum laude".

Tesis de Maestría.

Diego L Medina Sanabria.

"Expresión del neuropéptido somatostatina en la línea celular tiroidea FRTL-5". Universidad Internacional de Andalucía (Santa María de la Rábida, Palos de la Frontera, Huelva). 1997. Directora: Pilar Santisteban. Calificación: Apto "cum laude".

Palabras clave

Expresión génica. Transcripción basal. Transcripción específica de tejido. Regulación hormonal, Transducción de señales. Ciclo celular.

Departamento de Enzimología y Patología Molecular

Mecanismos de control del metabolismo de carbohidratos.

Investigador principal:	Aragón, Juan José, Catedrático UAM
Becarios predoctorales:	Sánchez, Cristina Santamaría, M ^a Belén Hermida, Carmen
Colaboraciones:	Heinisch, J.J. (Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Alemania) Orosz, F., Ovádi, J., (Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungría) Fernández- Mayoralas, A., Martín-Lomas, M. (Instituto de Química Orgánica CSIC, Madrid)
Personal de Apoyo:	Sánchez, Valentina

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

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

Con esta línea se continua nuestro interés en el estudio de las bases moleculares de la conducta reguladora de este enzima clave en el control del metabolismo glucídico. Para ello utilizamos el isozima C de tumor ascítico y el M de músculo humano, como modelos de fosfofructokinasa (PFK) reguladora, y el de *Dictyostelium discoideum*, como isozima no alostérico. Hemos estudiado la expresión del gen de la PFK-C a lo largo del crecimiento tumoral en ratones y expresado su cDNA en levadura, habiéndose purificado y caracterizado el enzima recombinante. Actualmente tratamos de obtener proteínas quiméricas entre este isozima y el de músculo con objeto de identificar el dominio o dominios responsables de las características reguladoras que son peculiares del enzima tumoral. Respecto al isozima no regulador de *D. discoideum*, se han obtenido formas mutantes mediante manipulación de su secuencia que exhiben cooperatividad para el fructosa-6-P y que presentan propiedades alostéricas, esto nos ha permitido identificar un dominio estructural adicional a otros isozimas reguladores que explicaría la conducta de esta PFK y que ahora estamos caracterizando. En colaboración con el Dr. J.J. Heinisch de la Heinrich-Heine-Universität de Düsseldorf estamos tratando de obtener y caracterizar cepas de *S. cerevisiae* carentes de actividad PFK que tengan integrado el gen de DdPFK a nivel cromosómico para evaluar el valor *in vivo* de los mecanismos del control de este enzima en levadura

Interacción de fosfofructokinasa eucarióticas con proteínas del citoesqueleto.

(M.B. Santamaría, y J.J. Aragón, en colaboración con los Drs. F. Orosz y J. Ovadi)

Es conocido que varios de los enzimas glicolíticos pueden interaccionar *in vitro* con varios tipos de proteínas del citoesqueleto como tubulina y microtúbulos. En el caso de la PFK de músculo de conejo (RmPFK) esto origina una inhibición significativa de su actividad. Nos planteamos si la naturaleza reguladora de este enzima estaría implicada en ese efecto, por lo que lo hemos estudiado empleando de forma comparada el isozima no regulador de *D. discoideum* (DdPFK). Hemos encontrado que la actividad de este último no se afecta por tubulina ni por microtúbulos, lo que estaría a favor de la hipótesis anterior. En cambio y contrariamente a RmPFK, la DdPFK se comporta como un potente inhibidor de la polimerización de tubulina. Estamos caracterizando la interacción de DdPFK con tubulina y su relevancia fisiológica.

Utilización de galactosil-xilosas para la valoración incruenta de lactasa intestinal. Metabolismo de glutamina y glucosa en células de hibridoma

(C. Hermida y J.J. Aragón)

La primera de estas sublíneas continúa nuestro interés en la puesta a punto de metodologías no invasivas que permiten la valoración *in vivo* de la actividad lactasa intestinal con vistas a su empleo en el diagnóstico de la deficiencia de este enzima en lactantes y, en general, de la integridad funcional de la mucosa intestinal. En colaboración con los Drs. A. Fernández-Mayoralas y M. Martín-Lomas del Grupo de Carbohidratos del Instituto de Química Orgánica del CSIC, Madrid, en cuyo laboratorio se lleva a cabo la síntesis de los sustratos empleados, estamos evaluando la eficacia de 2- y 3-galactosil-xilosa frente a la 4-galactosil-xilosa previamente utilizada, respecto a la que presentan ventajas catalíticas *in vitro*. El seguimiento del declive fisiológico en la actividad del enzima en ratas lactantes está haciendo posible estimar con precisión la correlación entre el nivel de enzima en mucosa intestinal y la excreción en orina de xilosa procedente del disacárido administrado oralmente a los animales. Respecto al estudio del metabolismo de glucosa y glutamina en células de hibridoma, estamos procediendo a la caracterización desde el punto de vista de su metabolismo y producción de anticuerpos monoclonales de clones seleccionados por su capacidad de crecimiento en ausencia de glutamina y en presencia de elevadas dosis de amonio y que por estas razones son de potencial interés para la optimización del cultivo de hibridomas.

Publicaciones

- Aragón, J.J., Cañada, F.J., Fernández-Mayoralas, A., López, R., Martín-Lomas, M. and Villanueva, D. (1996). A direct enzymatic synthesis of β -d-galactopyranosyl-d-xylopyranosides and their use to evaluate rat intestinal lactase activity *in vivo*. *Carbohydr. Res.* 290, 209-216.
- Estévez, A.M., Martínez-Costa, O., Sánchez, V. and Aragón, J.J. (1997). Cloning, sequencing and developmental expression of phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 243, 442-451.
- Sánchez-Martínez, C. and Aragón, J.J. (1997). Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS lett.* 409, 86-90.

Palabras clave

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

Caracterización de Nuevos Genes Humanos y su Posible Implicación en Enfermedades Hereditarias.

Investigadores Principales:	Coloma, Antonio Profesor Titular UAM Cruces, Jesús, Profesor Titular UAM
Investigadores Asociados:	Pérez Jurado, Luis Pediatra, Profesor Honorario UAM Caballero, Amelia, Profesora Titular UAM
Becarios Predoctorales:	Martínez de Arrieta, Cruz de la Puente, Aránzazu
Estudiante Master Biotecnología:	Casas, Pilar (1997)
Becarios 2º ciclo:	Sesto, Angela (desde julio 1997)
Personal de Apoyo:	Candel, Elena
Colaboraciones:	Bernal, Juan, IIB

Cartografiado cromosómico del gen humano de neurogranina y estudio de la regulación de su expresión.

(Cruz Martínez de Arrieta, Antonio Coloma Juan Bernal)

Hemos caracterizado recientemente el gen humano *NRGN* que codifica neurogranina. Está localizado en el cromosoma 11q 24 y muestra una gran similitud con los genes homólogos de diversos mamíferos. La expresión de *NRGN* está regulada por la hormona tiroidea, como se había observado previamente en otros mamíferos. *NRGN* contiene en su intrón 1 una secuencia de 36 pb (que hemos designado SURT36), que determina un sitio de unión del heterodímero TR/RXR. La confirmación de la funcionalidad se ha realizado mediante transfección en células COS7. Los resultados muestran que la expresión del gen testigo CAT está regulada por hormona tiroidea, cuando en su región promotora se inserta el elemento SURT36.

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

(Jesús Cruces, Luis Pérez Jurado, Antonio Coloma, Amelia Caballero Angela Sesto)

El gen POMT1 es el ortólogo humano del gen "*rotated abdomen*" (*rt*) de *D. melanogaster*, cuya mutación homocigota recesiva es causante de anomalías musculares en la larva. Por tanto, mutaciones similares en humanos podrían ser la causa de algún tipo de distrofia muscular congénita (DMC). Este gen codifica una proteína O-manosil transferasa y es la primera enzima con esta actividad descrita en mamíferos (hasta la fecha sólo se conocía esta actividad en levadura). Este gen humano se ha estudiado exhaustivamente: cDNA, estructura intrón-exón, expresión diferencial en tejidos, localización cromosómica, etc. Actualmente, estamos investigando su posible implicación en ciertas distrofias musculares candidatas: Síndrome de Walker-Warburg, distrofia muscular congénita con desmielinización sin déficit de merosina y MEB (músculo, ojo cerebro).

Caracterización de los genes deletados en la región cromosómica 7q11.23 responsable del Síndrome de Williams

(Luis Pérez Jurado, Antonio Coloma, Jesús Cruces)

El síndrome de Williams-Beuren (SW) es un trastorno del desarrollo con manifestaciones multisistémicas que afectan fundamentalmente al sistema nervioso, al aparato cardiovascular y al tejido conectivo. Está causado por haploinsuficiencia para genes deletados en la banda cromosómica 7q11.23. Hemos definido previamente que las deleciones son de tamaño casi idéntico en la mayoría de los pacientes, ocupando entre 1.5 y 2 Mb de secuencia e incluyendo a un número todavía no determinado de genes. En los puntos que flanquean la región deletada existe una duplicación genómica que incluye al menos un gen, DIWS1 (Duplicated In the Williams Syndrome region-1). En el cromosoma 7 deletado, se pierde la copia telomérica de DIWS1 junto con todo el material genómico de copia única existente entre la región duplicada, mientras que se retiene la copia centromérica. La copia telomérica deletada codifica el factor de iniciación de la transcripción TFII-I, que activa promotores sin caja TATA. Diversas observaciones sugieren que el mecanismo mutacional más frecuente en el SW es la recombinación desigual meiótica tras un mal alineamiento cromosómico propiciado por la duplicación genómica que incluye DIWS1. Estamos además caracterizando otros genes incluidos en el intervalo deletado, especialmente GBL1, que codifica una proteína con homología a las β -transducinas y cuya hemiciquiosidad podría contribuir a alguno de los aspectos del fenotipo del SW.

Estudio de la organización de secuencias alfoide del centrómero del cromosoma 7 humano

(Aránzazu de la Puente, Jesús Cruces)

Las regiones centroméricas de todos los cromosomas humanos contienen secuencias alfoide. Hemos caracterizado la organización de estas secuencias alfoide en el centrómero del cromosoma 7 humano, así como las secuencias adyacentes a estos bloques alfoide para estudiar su posible contribución a la estructura y función del centrómero. En este cromosoma se habían descrito 2 grandes bloques alfoide: Z1 (1,5-3,0 Mb) y Z2 (100-500 kb) separados por unas 500 kb de secuencia no alfoide. Hemos identificado 2 nuevos bloques de secuencias alfoide que hemos denominado Z5 y Z6 separadas por 100-140 kb de secuencia no alfoide. Estas secuencias pertenecen a la familia supracromosómica 4, que se caracteriza por carecer de repeticiones de orden superior. Esta región se ha posicionado en el brazo "p" del cromosoma 7 por diversas técnicas: análisis de ligamiento genético, análisis de híbridos de radiación, electroforesis en campo pulsado, FISH y "fiber-FIS" en las proximidades del bloque Z2. Además, en esta región Z5/Z6 hemos identificado otros tipos de secuencias moderadamente repetidas: MER22, MTLA1@2 y Alu, así como una isla CpG, indicativa de un posible gen. Finalmente, hemos realizado un "contiguo" de YACs que comprende toda la región del centrómero del cromosoma 7 humano.

Publicaciones

Martínez de Arrieta, C., Pérez Jurado, L., Bernal, J., and Coloma, A., (1997). Structure, Organization, and Chromosomal Mapping of the human Neurogranin gene (*NRGN*). Genomics 41, 243-249.

Tesis Doctorales

Aránzazu de la Puente Rodríguez.

"Análisis estructural de secuencias repetidas en la región pericentromérica del cromosoma 7 humano". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Director: Cruces, Jesús. Calificación: Apto "cum laude"

Palabras clave

Genética Humana, Proyecto Genoma Humano, enfermedades hereditarias, secuencias alfoide, neurogranina, distrofias musculares congénitas, Síndrome de Williams.

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

Investigador principal : Fernández de Heredia, Claudio, Profesor de Investigación. Dr vinculado "ad Honorem".
Becarios predoctorales : Fernández, Elena (Enero-Julio 1996)
Personal de apoyo : Navarro, M^a Asunción

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

(Claudio F. Heredia)

Hemos estudiado el efecto de hexosas con distintos sistemas de transporte y fosforilación, sobre la utilización de maltosa por un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* constitutivo para la vía de utilización de galactosa. Tanto galactosa, como manosa y fructosa (y análogos estructurales) inhiben la utilización de maltosa por acción a dos niveles: transporte del disacárido y fosforilación de la glucosa generada intracelularmente por hidrólisis de la maltosa. El transporte de maltosa es menos afectado que la fosforilación de glucosa. Una vez en la célula, la maltosa es hidrolizada y la glucosa excedente se excreta al medio. Si se acumulase en la célula, la glucosa podría alcanzar concentraciones tan altas como 200-300 mM. Además del bien conocido efecto inactivador de la glucosa sobre el transportador de maltosa, hemos visto que galactosa también inactiva el sistema y la inactivación por galactosa se ve potenciada por maltosa que no tiene "per se" poder inactivador. Cepas de levadura en que las vías de utilización de maltosa y galactosa son inducibles, se comportan de modo similar al mutante constitutivo para galactosa. El uso de maltosa como fuente de glucosa intracelular, ha permitido descubrir las interacciones a nivel de fosforilación de hexosas que de otro modo hubiesen pasado inadvertidas.

Síntesis de nucleósidos monofosfato a partir de 2',3'nucleótidos cíclicos

(Elena Fernández y Claudio F. Heredia)

Hemos caracterizado, en *Fusarium culmorum*, dos actividades fosfodiesterasas que hidrolizan respectivamente los enlaces 2'y 3' de 2',3'-nucleótidos cíclicos, dando los correspondientes nucleósidos 3'ó 2'monofosfatos. La 2'fosfodiesterasa es mayoritaria, existe en el micelio y se excreta al medio cuando el hongo se crece en medios deficientes en fosfato. Hidroliza preferentemente nucleótidos con bases púricas que pirimídicas. La actividad 3'fosfodiesterasa existe en micelio y no se excreta al medio. Hemos encontrado también una actividad ribonucleasa resistente a inhibición por 2'GMP y por tanto distinta de la RNAsa F1 previamente caracterizada por otros.

Publicaciones

Nevado J. and Heredia C.F. (1996). Galactose induces in *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity of the utilization of hexoses to inhibition by D-Glucosamine. Can.J.Microbiol. 42, 6-11.

Díaz A.R. and Heredia C.F. (1996). Purification and characterization of Artemia 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. Biochim. Biophys. Acta 1290, 135-140.

Tesinas de Licenciatura

Elena María Fernández Centeno

Exploración de fosfodiesterasas activas sobre 2',3'-nucleótidos cíclicos en *Fusarium culmorum*.
Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. 1996. Director: Claudio F. Heredia.

Palabras Clave

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

Mecanismos de resistencia celular a MTX

Investigador Principal:	Llorente, Pilar, Investigador Científico
Investigador asociado:	Montero, Celia, Profesora Asociada UAM (febrero 1996 y mayo-septiembre 1997)
Becario predoctoral:	Abad de Diego, Ana
Personal de apoyo:	Argomaniz, Luisa
Investigadores asociados:	Rivera, Pilar y Grau, Rosa (Centro de Investigación y Desarrollo-CSIC)
	Arán, Vicente (Instituto Rocasolano-CSIC)

La resistencia adquirida a MTX, y a otros análogos de folato en desarrollo, continúa siendo la principal limitación en su efectividad clínica. Uno de los determinantes en la citotoxicidad ejercida por estas drogas es el proceso de síntesis intracelular de poliglutamilación mediada por la enzima filipoliglutamato sintetasa (FPGS).

Nuestro grupo está realizando un estudio de los posibles mecanismos de resistencia celular a MTX, enfocado fundamentalmente en las propiedades de la actividad FPGS de células leucémicas murinas (L5178Y) con diferente sensibilidad a MTX y a evaluar la FPGS, como una posible "diana" de acción de nuevas drogas terapéuticas, en las células sensibles y resistentes a MTX, evaluando el efecto inhibitorio de la FPGS por metabolitos de la hidrólisis de folato y MTX, previamente aislados, caracterizados y sintetizados.

Niveles de poliglutamilación en células de LLA, L5178Y, resistentes a MTX

(Pilar Rivera, Rosa Grau, Ana Abad, Celia Montero, Luisa Argomaniz y Pilar Llorente)

La relación entre el grado de resistencia a MTX y los niveles de poliglutamilación, actividad FPGS, se ha estudiado tratando células de LLA murina (L5178Y) con incrementos progresivos de la droga. En las sublíneas resistentes obtenidas, MTX/R16, MTX/R600, MTX/R3500 y MTX/R10500, en las que previamente se habían establecido parámetros clásicos asociados al grado de resistencia, captación de la droga y actividad de la enzima DHFR, se han determinado los niveles de actividad FPGS y poliglutamilación.

Una progresiva disminución en la actividad FPGS, relacionada con el grado de resistencia, que llega a ser indetectable en las sublíneas con alto CI_{50} , indica la implicación de la poliglutamilación en la resistencia a MTX de estas líneas celulares. La especificidad y cinética de los sustratos de la FPGS de la línea celular MTX/R16 son similares a las observadas con las células del mismo grado de resistencia obtenidas "in vivo".

Inhibición de la actividad FPGS en células de LLA, L5178Y, por metabolitos de la hidrólisis de folato y MTX

(Ana Abad, Celia Montero, Vicente Arán, Luisa Argomaniz y Pilar Llorente)

Según nuestro objetivo de diseño y síntesis de nuevos fármacos antineoplásicos, utilizando como "blanco" la inhibición de la actividad FPGS, hemos estudiado el efecto inhibitorio de la pterina, 6-carboxilato pterina, 6-metil pterina y 6-hidroximetil pterina, así como de sus amino-derivados correspondientes sobre la actividad FPGS en células L5178Y sensibles y resistentes, MTX/R16, a MTX.

Los resultados obtenidos señalan la existencia de diferencias en niveles de inhibición de la poliglutamilación entre ambas líneas celulares que podrían deberse a cambios cinéticos respecto a los sustratos de la reacción enzimática, especialmente en la afinidad por glutámico, aumentada significativamente en las células resistentes a la droga, MTX/R16, que podrían explicar la disminución de poliglutamilación descrita entre las alteraciones bioquímicas

relacionadas con los fenómenos de resistencia a antifolatos.

Publicaciones

Montero,C., Llorente,P., Argomaniz, L and Menendez,M. (1996). Thermal stability of *Artemia* HGPRT:Effect of substrates on inactivation kinetics.Int. J. Biol.Macromol. 18, 255-262.

Martín -Jadraque, R.,Montero,C., Lopez, J., Argomaniz, L., Llorente, P and Martín-Jadraque, L (1996). Producción de urato en un modelo de isquemia y reperfusión miocárdica. Rev.Española de Cardiología 49, 281-287.

Palabras clave

leucemia, L-5178Y, MTX, resistencia celular, poliglutamilación

Metabolismo y función de dinucleósido polifosfatos

Investigadores Principales:	Sillero, Antonio, Catedrático UAM. Günther, M ^a Antonia, Investigador Científico
Investigador Asociado:	Zaera, Eulalio, Colaborador Científico (hasta Marzo 1996)
Profesores visitantes:	Fontes, Rui (Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Porto, Portugal) Marques, A. Franklim, (Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Porto, Portugal, hasta Junio 1997) Dukhovich, Alexey (Moscow State University, Moscú, Marzo 1996 hasta Marzo 1997) Biryukov, Alexander (Academia Rusa de Ciencias, Moscú, Noviembre 1996 hasta Enero 1997)
Becarios predoctorales:	Madrid, Olga Atencia, Eva Ana (desde Marzo 1997) Mancilla, Francisco (Noviembre 1996 hasta Junio 1997)
Personal de Apoyo:	Diego, Ana Isabel de Serrano, Juan Ramón (hasta Junio 1996) López, Raquel (Noviembre 1996 hasta Noviembre 1997) Galy-Ache, Myriam (desde Junio 1997)

Metabolismo de nucleótidos en cerebro

(A.F. Marques, E. Atencia, M.A. Günther & A. Sillero)

En el citosol de cerebro de rata se había descrito una 5'-nucleotidasa (e-Ns) y se creía que esta era la única 5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5) presente en esa fracción subcelular. En nuestro laboratorio se ha purificado a homogeneidad la nucleotidasa IMP/GMP específica (c-N-II) y se han estudiado sus propiedades más relevantes. Entre ellas destaca su activación por dinucleósido polifosfatos y por polifosfatos. Estos mismos compuestos son efectores positivos de la actividad fosfotransferasa del enzima.

Metabolismo de los 2',3'-dideoxynucleótidos

(O. Madrid, E. Zaera, M.A. Günther & A. Sillero)

Los 2',3'-dideoxynucleósido trifosfatos (ddNTP) y los di-2',3'-dideoxynucleósido tetrafosfatos (ddNp4ddN) se comportan de manera diferente a los correspondientes análogos NTP y Np4N como sustratos de la luciferasa de luciérnaga, dinucleósido tetrafosfatasa y fosfodiesterasas. Esta propiedad de los di-2',3'-dideoxynucleótidos puede tener un cierto interés en la terapéutica de enfermedades virales y tumorales.

Mecanismo de reacción de la luciferasa

(R. Fontes, A. Dukhovich, M.A. Günther & A. Sillero)

El complejo E-luciferina(LH2)-AMP puede seguir dos rutas diferentes: hacia la producción de luz y hacia la formación del complejo E-dehidroluciferina(L)-AMP. Este último

paso tiene un efecto inhibitor sobre la emisión de luz ya que las moléculas de enzima pueden quedar atrapadas en un complejo incapaz de producir luz. Los efectos del CoA y de los nucleósido trifosfatos (NTP) tienen un efecto diferente sobre la emisión de luz. El CoA se combina con la L del complejo dando lugar a E-L-CoA, produciendo la liberación de moléculas de enzima, e incrementando la producción de luz. Los NTPs reaccionan con la parte adenilica del complejo dando lugar a la síntesis de Ap₄N e incrementado muy débilmente la producción de luz.

Síntesis de dinucleósido polifosfatos

(R. Fontes, M.A Günther & A. Sillero)

Se ha visto que la acil-CoA de *Pseudomonas* es capaz de catalizar la síntesis de nucleósido 5'-polifosfatos (pnN) y de dinucleósido polifosfatos. .

Publicaciones

Dukhovich, A., Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1996). Time course of luciferyl adenylate synthesis in the firefly luciferase reaction. *FEBS Lett.* 395, 188-190.

Sillero, A. (1996). Función y dinámica del agua en los seres vivos. XI Seminario-Curso CIRA. Centro Interamericano de Recursos da Água. Universidade Catolica do Salvador. Salvador (Bahia) Brasil.

Sillero, M.A.G., Madrid, O., Zaera, E. y Sillero, A. (1997). 2',3'-Dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (ddNp₄ddN) behave differently to the corresponding NTP and Np₄N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterases. *Biochim. Biophys. Acta* 1334, 191-199.

Fontes, R., Dukhovich, A. Sillero, A. y Günther Sillero, M.A. (1997). Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase: Effect of dehydroluciferin, Coenzyme A and nucleoside triphosphates on the luminescent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 445-450.

Tesis Doctorales

Agostinho Franklim Pinto Marques.

Purificacao e caracterizacao da 5'-nucleotidase citosólica (IMP/GMP específica) de cerebro de rato. Papel no metabolismo dos nucleótidos purínicos e efeito dos dinucleósidos polifosfatos. Universidad de Porto. Faculdade de Farmacia. Oporto, Portugal. 1997. Directores Maria A. Günther y Natércia A. A. Teixeira. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Palabras clave:

Acil CoA sintetasa, dinucleósido polifosfatos, dideoxinucleótidos, IMP/GMP 5'-nucleotidasa, luciferasa, polifosfatos.

Departamento de Estructura y Función de Biomoléculas

COT quinasa en linfocitos T

Investigador principal :	Alemany, Susana, Colaborador Científico
Investigador Asociado:	Calvo, Victor, Profesor Ayudante UAM
Becarios postdoctorales:	Lisbona, Carlos (hasta Noviembre 1997) Sánchez-Góngora, Estrella (desde Septiembre 1997)
Becarios predoctorales:	Ballester, Alicia (hasta Septiembre 1997) Tobeña, Rafael (hasta Diciembre 1997) Velasco, Ana (desde Abril 1997)

Regulacion de la activacion de linfocitos T por COT quinasa

COT quinasa ha sido definida como una MAP quinasa quinasa quinasa. Nosotros hemos observado que juega un papel esencial en la producción de IL-2 y TNF- α . El incremento de la secrecion de estas citoquinas se produce por su regulacion sobre los sitios AP-1 y NFAT de los respectivos promotores. Estos datos explican su capacidad de producir linfomas.

Analisis de la zona 5' del gen de COT quinasa

En el estudio de la expresion del gen COT, hemos observado la existencia de al menos 3 transcritos que difieren en su zona 5' no traducida regulados al menos dos de ellos por un promotor inducible en linfocitos T por señales que llevan a estas células a la entrada en el ciclo celular.

Publicaciones

- Tobeña, R, Horikawa, S., Calvo, V. and Alemany, S. (1996). Interleuquin-2 induces S-adenosil-L-methionine synthetase gene expression in rat lymphoblats. *Biochem.J.* 319, 929-933.
- Carrera, A., Calvo, V., Borlado, L., Paradis, H., Alemany, S., Roberts, TM. and Martinez, A.C. (1996). The catalytic domainn of plck but not its regulatory domain is sufficient for interleukin-2 production. *J.Immunol.* 157, 3775-3782
- Ballester, A., Tobeña, R., Calvo, V. and Alemany, S (1997). COT kinase regulates Interleukin-2 production in Jurkat T lymphocytes. *J.Immunol.* 159, 1613-1618.
- Lisbona, C. Alemany, S. and Fernandez-Renart, M. (1997). Regulation of ERK2 dephosphorylation in G1-stimulated rat lymphoblasts. *J.Clin. Immunol.* 17, 494-501.

Tesis doctorales

Alicia Ballester

“Regulacion de la expresión genica de COT quinasa y analisis de su papel en la activacion de linfocitos T. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Directora: Susana Alemany. Calificación: Apto “cum laude”

Palabras clave

COT quinasa, MAP quinasa quinasa quinasa, activacion linfocitos T, interleuquina-2, TNF- α

Modulación Del Proteasoma y Enfermedades Autoinmunes

Investigador Principal:	Castaño, José G. Catedrático UAM.
Investigador Asociado:	Sagarra, Rosa Profesor Titular UAM
Becarios Predoctorales:	Rodríguez-Vilariño, Susana Mayo, Isabel
Personal de apoyo:	Oliva, Joaquín

Modulación de la actividad del proteasoma

(S. Rodríguez-Vilariño, J.G. Castaño)

Modulación por interconversión: 1) la caseína quinasa I es responsable de la fosforilación en serina de al menos dos subunidades alfa del proteasoma, C2 y C8. Estas dos subunidades se encuentran también fosforiladas *in vivo* y hemos mostrado que los residuos de serina fosforilados se encuentran en el COOH terminal de ambas subunidades. 2) fosforilación por tirosina kinasas (en colaboración con J. Martín y A. Cuadrado). Hemos caracterizado 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 del proteasoma en la proteólisis en el SNC

(S. Rodríguez-Vilariño, J.G. Castaño)

Tras el estudio de localización del proteasoma a nivel histoquímico y ultraestructural en diferentes regiones del SNC de rata, hemos continuado con la caracterización de la localización del proteasoma en células gliales y su posible relación con el procesamiento de proteína básica de mielina en oligodendrocitos. En este sentido la proteína básica de mielina es un excelente sustrato del proteasoma purificado, por otro lado hemos observado que la proteína básica de mielina además de ser degradada induce una reacción de procesamiento autoproteolítico del proteasoma que afecta a una de sus subunidades alfa.

Proteasa ClpP de E. coli (EClpP) y humano (HClpP)

(R. Sagarra, I. Mayo, J.G. Castaño)

En esta línea de trabajo hemos identificado la presencia de anticuerpos anti-EClpP en cirrosis biliar primaria (en colaboración con A. Pares y J. Rodes, Hospital Clínico Barcelona) y caracterizado el epítipo contra el que van dirigidos estos anticuerpos. Por otro lado hemos clonado y expresado en bacterias el homólogo humano de EClpP (HClpP). Mediante anticuerpos específicos contra HClpP hemos podido demostrar que se localiza fundamentalmente en mitocondrias y estamos en proceso de caracterización de su posible función en la proteólisis intramitocondrial.

Publicaciones

Castaño, J.G., Mahillo, E., Arizti, P., & Arribas, J. (1996). Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 35, 3782-3789.

Mengual, E., Arizti, P., Rodrigo, J., Giménez-Amaya, J.M., & Castaño, J. G. (1996). Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *J. Neurosci.* 16, 6331-6341.

Palabras clave

proteasoma, proteólisis, fosforilación, SNC, ClpP, autoinmunidad

Resonancia Magnética en Biología y Medicina

Investigadores Principal:	Cerdán, Sebastián; Colaborador Científico
Investigador asociado:	Ballesteros, Paloma; Catedrática UNED.
Investigador contratado	Cruz, Fátima (desde Septiembre 1997) López, Emilio (hasta Junio 1997)
Investigadores visitantes:	García-Pérez, Ana Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá de Henares (hasta Abril 1996). Stürtz, Laszlo Abteilung Physikalische Chemie, RTWH Aachen, Alemania (1997). Mawell, Ross Gray Laboratory Cancer Research Trust, Mount Vernon Hospital Northwood, Gran Bretaña (1996).
Becarios Predoctorales:	Alvarez, José García-Martín, M ^a Luisa García-Espinosa, M ^a Antonia
Colaboraciones:	Roda, José M ^a , Carceller, Fernando, Pascual, José M ^a , Servicio de Neurocirugía, Hospital La Paz, Madrid
Personal de apoyo:	Sánchez, Jerónimo (Noviembre 1996- Septiembre 1997)

Nuestro laboratorio desarrolla nuevas aplicaciones de la Espectroscopía e Imagen por Resonancia Magnética (RM) en Biología y Medicina, con énfasis en el estudio del metabolismo cerebral y hepático en condiciones tanto fisiológicas, como patológicas. En estos dos últimos años hemos iniciado además, nuevas líneas de investigación en algunos aspectos de la RM diagnóstica con potencial interés comercial.

Bases biológicas del contraste en imágenes de RM

(J. Alvarez, M.L. García-Martín, E. Lopez, A. García-Perez y S. Cerdán)

A pesar de que la imagen por RM es uno de los métodos diagnósticos utilizados más rutinariamente en la actualidad, las bases biológicas que subyacen al contraste observado entre diversos tejidos permanecen aun poco conocidas. Entre otros procesos biológicos que contribuyen al contraste RM estamos investigando: (i) la difusión de agua y su tráfico en y entre diversos compartimentos subcelulares, (ii) los intercambios de agua entre metabolitos y solvente en reacciones de hidratación-deshidratación, (iii) la proporción de agua inmovilizada e invisible a la RM como solvatante de iones, pequeños metabolitos y macromoléculas y (iv) la proporción de agua inmovilizada e invisible a la RM en el interior de células.

El reciclaje de piruvato; un nuevo ciclo metabólico intercelular en el cerebro de rata

(F. Cruz y S. Cerdán)

El reciclaje de piruvato es una nueva ruta metabólica cerebral descrita por nuestro laboratorio en 1990 (Cerdán y cols, *J. Biol.Chem.* 1990, 265,12916). En los últimos años hemos estudiado el papel de este ciclo intercelular en el contexto de las reacciones metabólicas neurona-glia. Hemos podido comprobar que este sistema se desarrolla en el cerebro a partir de la segunda semana de vida y que cambia localización durante el desarrollo, siendo glial en el periodo fetal y neuronal en el estado adulto. Este sistema parece estar implicado en los mecanismos de protección metabólica contra el daño isquémico en el cerebro, generando

NADPH y acetil-CoA a partir de sustratos alternativos a glucosa.

Efectos de la diabetes experimental sobre el metabolismo neuronal y glial

(M.A. García Espinosa, M.L. García-Martín y S. Cerdán)

Los mecanismos que subyacen a estas alteraciones neurológicas observadas en la diabetes prolongada permanecen aun poco explorados. En este periodo hemos demostrado que la diabetes experimental inducida por estreptozotocina induce un descenso en el metabolismo de (1-¹³C) glucosa en neuronas y un ligero incremento del metabolismo de este precursor en las células de glia.

Resonancia Magnética en las Enfermedades Neurodegenerativas

(J.M. Pascual, F. Carceller, J.M. Roda, R. Maxwell y S. Cerdán)

Estamos desarrollando un sistema experto para el diagnóstico automático de tumores cerebrales por espectroscopía de ¹H RMN, utilizando técnicas inteligencia artificial. Durante este proyecto se ha construido una amplia base de datos (>200 biopsias) de tumores cerebrales obtenidos mediante cirugía intracraneal. El sistema experto diseñado abordará la identificación del tipo y grado de un tumor desconocido mediante la comparación automática de su espectro con todos los espectros de la base de datos. El sistema de comparación involucra técnicas de reconocimiento de patrones y redes neuronales. También hemos caracterizado mediante ¹³C RMN la alteraciones que induce la isquemia cerebral focal en las interacciones neurona-glia.

Nuevos agentes de contraste para Imagen Funcional por Resonancia Magnética

(P. Ballesteros, J. Alvarez y S. Cerdán)

Hemos obtenido las primeras imágenes microscópicas de pH de la literatura. Para ello se ha utilizado la nueva generación de indicadores de pH sintetizados en nuestro laboratorio y técnicas de imagen de desplazamiento químico 2D y 3D. Esta metodología permite obtener imágenes de pH de regiones microscópicas (100µx100µ) y podría resultar de utilidad en el diagnóstico por RM de microtumores y metástasis. También hemos completado el desarrollo de una nueva serie de agentes complejantes de Gd(III) de potencial utilidad como agentes de contraste paramagnéticos en MRI.

Regulación del pH intra- y extracelular en tumores

(M.L. García Martín, M.A. García-Espinosa, J. Alvarez, P. Ballesteros y S. Cerdán)

Estamos estudiando el papel de los transportadores de membrana en la homeostasis de pH durante la hepatocarcinogénesis experimental, así como la heterogeneidad de pH en microtumores y esferoides de diversas células. Durante la hepatocarcinogénesis se produce un aumento significativo en la contribución relativa del intercambiador Na⁺/H⁺ a la acidificación extracelular. También es posible visualizar en microscopía de RM (resolución 10x10 µm), una acidificación importante en el interior de esferoides de células C6 ó H35, que podría reflejar el gradiente de tensión de oxígeno en estos agregados de células tumorales.

Publicaciones

- López-Beltrán, E., Maté, M.J. y Cerdán, S (1996). Dynamics and environment of mitochondrial water as detected by ^1H NMR. *J. Biol. Chem.* 271, 10648-10653.
- Preece, N.E. y S. Cerdán (1996). Metabolic Precursors and compartmentation of cerebral GABA in Vigabratin treated rats. *J. Neurochem.* 67, 1718-1725.
- De Mateo, B., Zaderenko, P., López, P., Ballesteros, P. y Cerdán, S. (1996). Interactions between intracellular pH and cellular volume as detected by ^1H NMR. En: Eurospin Annual vol 1995-6 Editores; F. Podo, W.M.M.J. Bovée, J. de Certaines, O. Henricksen, M.O. Leach, D. Leibfritz. Publicaciones Istituto Superiore di Sanità, Roma pp. 397-406.
- Moldes, M., Cruz, F., García-Martín, M.L., García-Espinosa, M.A., Alvarez, J. y Cerdán, S. (1997). Effects of heavy water on hepatic intracellular pH and phosphatidylcholine turnover. A ^{31}P NMR study. *Cell and Mol. Biol.* 43, 731-740.
- Cruz, F., García-Martín, M.L., García-Espinosa, M.A. y S. Cerdán (1997). ^{13}C NMR: Methods and Applications. En: Syllabus: I Spectroscopy- II Methodology ESMRMB '97 Educational Program, Editor: J. Bittoun, European Society of Magnetic Resonance Medicine and Biology. Publicaciones Guerbet (1997) pp. 1-13.

Patentes

- Ballesteros, P., Gil, M.S., Zaderenko, P., Cerdán, S., Alvarez, J., Gillies, R.J., Natharajan, R., Van Sluis, R., Bhujwala, Z. (1997). Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo ^1H ó ^{19}F . P97/496.

Tesis de Licenciatura

- García-Martín, M.L.
Cinética de los intercambios ^1H - ^2H en el hígado perfundido de ratón detectada por ^{13}C RMN. Universidad autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 1996. Director: S. Cerdán. Calificación: Sobresaliente.
- García-Espínosa, M.A.
Efecto de la diabetes experimental sobre el metabolismo neuronal y glial en cerebro intacto de rata detectado por ^{13}C RMN. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 1996. Director: S. Cerdán. Calificación: Sobresaliente.

Palabras clave

Espectroscopía por Resonancia Magnética, Imagen por Resonancia Magnética, Reciclaje de piruvato, Isquemia cerebral, Metabolismo de Neuronas y Astroцитos, pH, Tumores, Agentes de Contraste.

Estudio de la función de una Caseína kinasa I en *Dictyostelium discoideum*

Investigador Principal: Fernández, Margarita, Profesor Titular UAM

Investigadores Asociados: Calés, Carmela, Profesor Asociado UAM

Becarios Predoctorales: Moreno, Gema
García, Paloma

Personal de Apoyo: Dominguez, Carmen

Clonaje y expresión de una CKI de *Dictyostelium*

(Gema Moreno, Carmela Calés, Margarita Fernández)

Hasta 1991 considerada una entidad única, se sabe en la actualidad que comprende una familia que constituye una rama distinta de la familia de protein 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 quimotaxis 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, hemos sobreexpresado esta proteína en bacterias y comprobado que tiene actividad caseína kinasa. Mediante la utilización de anticuerpos policlonales contra la proteína producidos en conejo, hemos llevado a cabo estudios de inmunolocalización de la proteína , estos estudios nos han llevado a proponer que la localización de la proteína cambia dependiendo de la fase del ciclo celular, sugiriendo que podría jugar algún papel en mitosis. Utilizando una construcción que contiene una resistencia a blastidina, se han generado transformantes que crecen en presencia del antibiótico. En la actualidad se está estudiando si los transformantes generados tienen o no interrumpido el gen que codifica para la CK1 de *Dictyostelium*. 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 β -endorfina"

(Carlos Lisbona, Susana Alemany, Margarita Fernández)

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 en el 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 esteroides de forbol, en particular la activación de las proteínas kinasas Raf y MAP; así como en el estudio de las fosfatases implicadas en la terminación de la señal mitogénica.

Publicaciones

- Renart, J., Behrens, M.M., Fernández-Renart, M. and Martínez, J.L. (1996). Immunoblotting Techniques. En "Immunoassay", (Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K., eds.), Academic Press, San Diego, pp. 537-554
- García, P. and Calés, C. (1996). Endoreplication in megakaryoblastic cell lines is accompanied by sustained expression of g1/s cyclins and downregulation of cdc25C. *Oncogene* 13, 695-703.
- Núñez, A. and Fernández-Renart, M. (1997). A proteolytic activated protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biochem.* 175, 177-185
- G. Vallejo, C., M. Seguido, A., and Fernández-Renart, M. (1997). Protein Kinases in mitochondria of the Invertebrate *Artemia franciscana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 9-16
- Lisbona, C., Alemany, S. and Fernández-Renart, M. (1997). Regulation of ERK2 dephosphorylation in G1 stimulated rat T lymphoblasts. *J. Clin. Immunol.* 17, 494-501

Tesis doctorales

- Paloma Garcia Rodriguez
"Mecanismos moleculares de la endoreplicación en la diferenciación megacariocítica".
Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Directora: Carmela Calés.
Calificación: Apto "cum laude".

Palabras clave

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

Regulación del metabolismo hepático de la metionina: relaciones estructura/función.

Investigadores principales:	Pajares, María de los Angeles, Colaborador Científico Mato, José María, Profesor de Investigación (hasta septiembre 1997)
Investigadores contratados:	Alvarez, Luis Corrales, Fernando (octubre 1996-septiembre 1997) Avila, Matías (hasta septiembre 1997)
Becarios predoctorales:	Mingorance, Jesús (hasta diciembre 1996) Sánchez, Estrella (hasta agosto 1997) Martínez, M ^a Luz (hasta julio 1997) Gil, Beatriz (hasta marzo 1997) López, M ^a Carmen (desde noviembre 1996) Yolanda Ruiz León (desde noviembre 1996 hasta noviembre 1997)
Personal de Apoyo:	Garrido, Francisco
Colaboraciones:	Rodríguez Arrondo, José Luis, Universidad del País Vasco Martínez Ripoll, Martín, Instituto Rocasolano, CSIC Too, H. Phon, National University of Singapore Deigner, H. Peter, Universidad de Heidelberg

Estudios de regulación y relaciones estructura/función en la metionina adenosiltransferasa de hígado de rata.

(M^a de los Angeles Pajares, Luis Alvarez, Jesús Mingorance, Estrella Sánchez, M^a Luz Martínez, M^a Carmen López, Beatriz Gil, Yolanda Ruiz, Francisco Garrido)

Obtención de mutantes en zonas específicas de la proteína para el análisis del papel de ciertos residuos en el equilibrio entre formas oligoméricas de la enzima. Además dichos mutantes se utilizan para estudios estructurales (cristalización, FTIR) en colaboración con los grupos de Dr. Rodríguez Arrondo y Martínez Ripoll. Se estudia también la regulación de esta enzima tanto a nivel de actividad como a nivel transcripcional.

Regulación y estudios de estructura/función en la betaína homocisteína metiltransferasa de hígado de rata.

(M^a de los Angeles Pajares, Luis Alvarez, Francisco Garrido, M^a Carmen López)

Obtención de la betaína homocisteína metiltransferasa de hígado de rata tras su sobreexpresión en E. coli. Caracterización de esta enzima y obtención de mutantes para estudios funcionales y estructurales.

Publicaciones

Gassó, M., Rubio, M., Varela, G., Cabré, M., Caballeria, J., Alonso, E., Deulofeu, R., Camps, J., Giménez, A., Pajares, M. A., Parés, A., Mato, J. M., Rodés, J. (1996). Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J. Hepatology* 25, 200-205.

Gil, B., Casado, M., Pajares, M. A., Boscá, L., Mato, J. M., Martín-Sanz, P., Alvarez, L. (1996). Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology* 24, 876-881.

- Martínez-Chantar,M.L, Pajares, M.A. (1996). Role of thioltransferases on the modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *FEBS Lett.* 397, 293-297.
- Mato JM. (1996). Bridging basic science and clinical research. *Clinical Science* 90:147-148.
- Mingorance,J., Alvarez,L., Sánchez-Góngora,E., Mato,J.M., Pajares,M.A. (1996). Site-directed mutagenesis of rat liver S-adenosylmethionine synthetase. Identification of a cysteine residue critical for the oligomeric state. *Biochem. J.* 315, 761-766.
- Pajares,M.A., Alvarez,L., Gil-Pérez,B., Martínez-Chantar,M.L., Mingorance,J., Sánchez-Góngora,E., Deigner,P., Avila,M., Mato,J.M. (1996). Regulation and structure of rat liver S-adenosylmethionine synthetase, a target enzyme for studies in liver injury. En: *Methionine metabolism. Molecular mechanism and clinical implications* (Mato,J.M., Caballero,A., eds.), Jarpyo Editores (Madrid), pp. 2-10.
- Sánchez-Góngora,E., Pastorino,J.G., Alvarez,L., Pajares,M.A., García,C., Viña,J.R., Mato,J.M., Farber,J.L. (1996). Increased sensitivity to oxidative injury in Chinese hamster ovary cells stably transfected with rat liver S-adenosylmethionine synthetase cDNA. *Biochem.J.* 319, 767-773.
- Alvarez,L., Sánchez-Góngora,E., Mingorance,J., Pajares,M.A., Mato,J.M. (1997). Characterization of rat liver-specific methionine adenosyltransferase gene promoter. *J.Biol. Chem.* 272, 22875-22883.
- Avila MA, Mingorance J, Martínez-Chantar ML, Casado M, Martín.Sanz P, Boscá L, Mato JM. (1997). Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology* 25, 391-396.
- Gil,B., Pajares,M.A., Mato,J.M., Alvarez,L. (1997). Glucocorticoid regulation of hepatic S-adenosylmethionine synthetase gene expression. *Endocrinology* 138, 1251-1258.
- Kotb M, Mudd HS, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Cantoni G. (1997). Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends in Genetics* 13, 51-52.
- Mato,J.M., Alvarez,L., Ortiz,P., Pajares,M.A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol.Ther.* 73, 265-280.
- Mingorance,J., Alvarez,L., Pajares,M.A., Mato,J.M. (1997). Recombinant rat liver S-adenosyl-L-methionine synthetase tetramers and dimers are in equilibrium. *Int.J.Biochem. Cell.Biol.* 29, 485-491.
- Sanchez-Bueno A, Greenwood MR, Varela-Nieto I, Marrero I, Gil B, Mato JM, Cobold PH. (1997) Inositol-phosphoglycan inhibits calcium oscillations in hepatocytes by reducing calcium entry. *Cell Calcium* 21, 125-133.
- Sánchez-Góngora E, Ruiz F, Mingorance J, An W, Corrales FJ, Mato JM (1997). Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical. *FASEB J.* 11, 1013-1019.

Tesis doctorales:

Jesús Mingorance Cruz.

"Expresión de la S-adenosilmetionina sintetasa de hígado de rata en *Escherichia coli* y análisis del papel estructural y funcional de sus grupos sulfhidrilo mediante mutagénesis dirigida". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 1996. Directores: María Pajares y Luis Alvarez. Calificación: Apto "cum laude"

Beatriz Gil Pérez.

"Regulación hormonal y en el desarrollo de la expresión de la S-adenosilmetionina sintetasa en hígado de rata". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 1997. Directores: María Pajares y Luis Alvarez. Calificación: Apto "cum laude"

M^a Luz Martínez Chantar.

"Regulación de la metionina adenosiltransferasa de hígado de rata por óxido/reducción: Identificación de los grupos implicados y posible catálisis por tioltransferasas". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 1997. Director: María Pajares. Calificación: Apto "cum laude"

Estrella Sánchez Góngora.

"Alteraciones del metabolismo de la metionina y sensibilidad al estrés oxidativo en células CHO que sobreexpresan la metionina adenosiltransferasa hepática". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 1997. Directores: María Pajares y José M^a Mato. Calificación: Apto "cum laude"

Palabras clave

Metionina, S-adenosilmetionina, metionina adenosiltransferasa, glutatión, betaína, betaína homocisteína metiltransferasa, óxido nítrico

Actividades mitogénicas en efluentes peritoneales humanos

Investigador principal:	Vara, Francisco, Profesor Titular UAM
Becarios Predoctorales:	Molina, Susana Aguilera, Abelardo Carcamo, Cristina
Colaboraciones:	Selgas, Rafael Fernández de Castro, Mercedes (Servicio de Nefrología del Hospital "La Paz", 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 mas 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 si sola, que ya no necesita la presencia de comitógenos para producir la división celular de la linea Swiss 3T3

Caracterización de las poblaciones celulares presentes en los efluentes peritoneales humanos

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

Los macrófagos son las células mas abundantes en el efluente peritoneal de los pacientes sometidos a CAPD. EL objetivo de este estudio era caracterizar fenotípicamente a los macrófagos a lo largo de este tratamiento y observar si había cambios en la función.

Por citometría de flujo se analizo la expresión de receptores de membrana y se observo que los niveles de CD11b, CD16, CD64 y CD14 iban disminuyendo con el tiempo de los pacientes en CAPD, llegando a ser un 50% de los niveles de partida. Los niveles de CD4 CD69 y CD71 eran muy débiles y carecían de CD71. No se observo cambios en HLA-DR ni otras proteínas de adhesión (CD11a, CD11c, CD18 y CD54).

Estos resultados demuestran que la CAPD afecta a la fagocitosis mediada por receptores Fcγ por reducir la expresión de CD16, CD64 y CD11b. Los niveles disminuidos de CD11b y CD14 también impedirían la adhesión de los macrófagos a las estructuras mesoteliales.

Publicaciones

Carcamo, C.; Fdez de Castro, M.; Selgas, R.; Jimenez, C.; Molina, S. y Vara, F. (1996). Long-Term Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Reduces the Expression of CD11B, CD14 and CD64 on Peritoneal Macrophages. *Perit. Dial. Int.* 16, 582-589.

Selgas, R.; Fdez de Castro, M.; Jimenez, C.; Carcamo, C.; Contreras, T.; Bajo, M.A.; Vara, F.; y Corbí, A. (1996). Immunomodulation of Peritoneal Macrophages by Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor in Humans. *Kidney Int.* 50, 2070-2078.

Palabras Clave

CAPD, Efluentes peritoneales, Factores de crecimiento, Poblaciones celulares del peritoneo, Macrofagos y Peritonitis

Departamento de Regulación de la Expresión Génica

Regulación de la Expresión Génica por los Receptores Nucleares en Células Hipofisarias y Neuronales: Interacción con otros Factores de Transcripción y con Factores Mitogénicos y Neurotróficos

Investigadora Principal:	Aranda, Ana, Profesora de Investigación
Investigadores Contratados:	Tolón, Rosa Sánchez-Pacheco, Aurora (desde Junio 1996)
Becarios Postdoctorales:	Martin, José (Abril-Agosto 1997) López, Judith (desde Febrero 1997)
Becarios Predoctorales:	Jimenez-Lara, Ana M ^a Palomino, Teresa Castillo, Ana Isabel Pérez-Juste, Germán Recio, Juan Angel (hasta Marzo 1997) Cañón, Estela (desde Abril 1997)
Investigador Visitante:	Müller, Verena (Mayo-Junio, 1996)
Personal de Apoyo:	Luengo, Carmen (hasta Diciembre 1996) Martínez de la Mata, Jorge (desde Enero 1997)

Interacción de los receptores nucleares con otros factores de transcripción y con factores de crecimiento en la regulación de la expresión de genes hipofisarios

(A.I. Castillo, A. Jimenez-Lara, J. López, T. Palomino, A. Sanchez-Pacheco, R. Tolón, A. Aranda)

La diferenciación celular en eucariotas es estimulada por moléculas extracelulares que regulan la transcripción de genes específicos de dos modos distintos: 1) activando receptores de superficie que inician cascadas de señales que activan factores de transcripción nucleares, y 2) uniéndose directamente a factores de transcripción con actividad dependiente de ligando, los receptores nucleares. Las células hipofisarias, así como las células inmortalizadas que representan a los progenitores de células hipofisarias lactotropas y/o somatotropas, nos proporcionan un interesante modelo para investigar las bases moleculares de la interacción entre ambas vías de transducción de señales en la activación génica selectiva. Hemos demostrado que la expresión de los genes de la hormona de crecimiento (GH), de la prolactina y del receptor RAR β 2, es regulada por diferentes ligandos de receptores nucleares (entre ellos las hormonas tiroideas, el ácido retinoico, la vitamina D3 y los estimulador de la proliferación de los peroxisomas). Tenemos evidencia de que la regulación transcripcional por los receptores nucleares implica no solamente la unión de los receptores al DNA, sino también interacciones directas proteína-proteína de los receptores con otros factores de transcripción y con componentes de la maquinaria transcripcional básica. Con respecto a los primeros en nuestro laboratorio hemos observado una fuerte interacción de los diferentes receptores nucleares con el factor de transcripción hipofisario GHF-1, que se une a los promotores de GH y prolactina. Por otra parte, hemos observado la interacción de los receptores con el TFIIB y el TBP. Estas interacciones podrían contribuir a la formación o estabilidad del complejo de iniciación transcripcional, así como al reclutamiento de estos factores al promotor. La regulación de la transcripción de los genes hipofisarios por los receptores nucleares parece también implicar su asociación con proteínas "coactivadoras" entre las cuales el factor CBP/p300 parece tener un papel esencial ya que dicho factor es capaz también de activar sinérgicamente con el GHF-1 y los receptores nucleares la expresión de los genes hipofisarios.

Hemos observado que la transcripción del gen de la prolactina se regula de forma coordinada por diferentes ligandos de los receptores nucleares y por factores de crecimiento con

receptores que poseen actividad tirosina kinasa como el IGF-1 o el FGF. Varias oncoproteínas celulares juegan un papel fundamental en la transducción de las señales que se originan tras la unión de estos factores a sus receptores. Hemos demostrado que la activación del promotor de la prolactina por estos factores implica la activación de Ras y de la MAPK que finalmente produce la fosforilación del factor de transcripción Ets que se une a varios sitios en este promotor. Este factor juega un papel fundamental en la expresión de este gen y coopera con el GHF-1 y los receptores nucleares produciendo una activación sinérgica de su transcripción. Aunque la activación de la vía Ras/Ets juega un papel prominente en la acción de los factores de crecimiento sobre el gen de la prolactina, recientemente hemos puesto de manifiesto que el IGF-1 causa la activación de la fosfatidil-inositol 3 kinasa, que es también requerida para la estimulación del gen de la prolactina.

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

(E. Cañón, G. Pérez Yuste, A. Aranda)

Diferentes receptores nucleares parecen jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica en células neuronales que tiene como consecuencia la parada de la proliferación y la inducción de diferenciación morfológica. Así, los retinoides producen una reversión del fenotipo maligno en células de neuroblastomas humanos que se acompaña de un aumento en la expresión de su propio receptor, RAR β 2, así como de los receptores de la neurotrofina BDNF (el oncogén *trkB*), promoviendo extensión de neuritas y parada de la proliferación celular. Por otra parte, en células de neuroblastoma que expresan de forma estable receptores de la hormona tiroidea T3, este ligando promueve inhibición del crecimiento y cambios morfológicos típicos de la diferenciación neuronal. En nuestro laboratorio hemos observado que estos efectos están asociados a la represión del oncogén *c-myc*. Este gen es un regulador central de la proliferación, aunque los mecanismos por los que regula el ciclo celular aún no se han aclarado completamente. Uno de los eventos moleculares requeridos para el paso a través del punto de restricción en la fase G1 tardía del ciclo celular es la inactivación por fosforilación de proteínas de la familia de retinoblastoma Rb, catalizada por las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La incubación con T3 inhibe significativamente la actividad de los complejos ciclinas/CDKs y altera la fosforilación de proteínas de la familia Rb. Las actividades de las CDKs están reguladas por fosforilación de las ciclinas y por su asociación con dos familias de proteínas inhibitoras denominadas colectivamente CKIs. Hemos demostrado que la T3 aumenta la expresión de la CKI p27 en células de neuroblastoma, y actualmente se están realizando estudios de la regulación de la expresión de diferentes componentes del ciclo celular por los receptores nucleares en células neuronales, así como su interacción con los factores de crecimiento que tienen un efecto opuesto al de los ligandos de los receptores y promueven efectos mitogénicos en este tipo celular.

En el modelo de las células PC12 es bien conocido que la unión del NGF a su receptor, el TrkA, produce una rápida inducción de los denominados "genes tempranos inmediatos" como *c-fos*, *c-jun*, NGFI-A o NGFI-B que codifican factores de transcripción. Estos se unirían a su vez a los promotores de diferentes genes de respuesta más tardía y todo este conjunto de cambios en la regulación de la expresión génica sería responsable de la respuesta neurotrófica. Aunque es indudable que la activación de Ras está implicada en la inducción de los genes tempranos, datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la inducción de *c-fos* o NGFI-B requiere, además de Ras, la activación de otra vía complementaria aún no identificada. Esta segunda vía de activación está además antagonizada transcripcionalmente por el RA que produce una importante inhibición de la proliferación de este tipo celular. En contraste con esta regulación antagónica, también hemos demostrado que el NGF y el RA cooperan en la inducción de la expresión de diferentes genes de respuesta tardía implicados en procesos de proliferación y diferenciación neuronal.

Activación del promotor del virus de inmunodeficiencia adquirida HIV-1 por las neurotrofinas y los receptores nucleares en células neuronales.

(J. Martín Nieto, J. Martínez de la Mata, J. A. Recio, A. Aranda)

Aunque los linfocitos y los macrófagos son las células diana más importantes para el HIV-1, existe la evidencia creciente de que el sistema nervioso central es también una diana importante de este virus y es bien conocido que la infección viral produce un daño cerebral masivo que tiene como consecuencia la aparición de demencia en muchos pacientes de SIDA. Ello nos ha llevado a investigar la actividad del LTR del HIV-1 en modelos de células neuronales. Los resultados que hemos obtenido indican que tanto el NGF en células PC12 como el RA en células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y producen una activación muy significativa del LTR del virus. Ello implicaría que la diferenciación neuronal podría jugar un papel fundamental en la susceptibilidad del cerebro a la infección viral y que el virus aprovecharía de forma oportunista las vías estimuladoras utilizadas en los procesos de diferenciación neuronal en provecho de su propia replicación. Este gen resulta, además, un modelo interesante para el estudio de la interacción entre las neurotrofinas y los receptores nucleares, ya que en el LTR existe un elemento de unión de receptores nucleares. Hemos determinado que los factores que se unen a elementos κ B y al elemento de respuesta hormonal median la activación de HIV-1 por neurotrofinas en células neuronales, y posteriormente se llevará a cabo la identificación de los factores de transcripción que median la activación del LTR del HIV-1 en este tipo celular.

Publicaciones

- García-Villalba, P., Jiménez-Lara, A. and Aranda, A.. (1996). Vitamin D interferes the transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 16, 318-327 .
- Cosgaya, J.M., García-Villalba, P., Perona, R. and Aranda, A. (1996). Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation, differentiation and gene expression. *J. Neurochem.* 66, 89-98.
- Cosgaya, J.M. and Aranda, A. (1996). Ras-mediated regulation of transforming growth factor β 1 gene expression by ligands of tyrosine kinase receptors in PC12 cells. *Oncogene* 12, 2651-2660.
- Cosgaya, J.M., Perona, R. and Aranda, A. (1997). Retinoic acid induces secretion of transforming growth factors by PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* 14, 579-587 .
- Cosgaya, J.M., Recio, J.A. and Aranda, A. (1997). Influence of Ras and retinoic acid on nerve growth factor induction of transin gene expression in PC12 cells. *Oncogene* 14, 1687-1696.
- García-Villalba, P., Jiménez-Lara, A., Castillo, A.I. and Aranda, A. (1997). Histone acetylation influences thyroid hormone and retinoic acid-mediated gene expression. *DNA Cell Biol.* 16, 421-431.
- Cosgaya, J.M., G. Pérez-Juste, Castillo, A.I. and Aranda, A. (1997). Growth factor ligands of tyrosine kinase receptors activate the Rous sarcoma virus promoter by a Ras- and Raf-dependent mechanism. *Gene* 188, 291-293.
- Castillo, A.I. and Aranda, A. (1997). Differential regulation of pituitary-specific gene expression by insulin-like growth factor 1 in rat pituitary GH4C1 and GH3 cells. *Endocrinology* 138, 5442-541.

Recio, J.A. and Aranda, A. (1997). Activation of the HIV-1 long terminal repeat by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 26807-26810.

Aranda, A. (1997). Receptores nucleares. En "Tratado de Medicina Interna" sección de Biología Molecular. (Rodés, Guardia. eds), p.658-665.

Tesis doctoral

Ana M. Jiménez-Lara

“Regulación de la transcripción por vitamina D3 en células hipofisarias: interacción con las hormonas tiroideas y el ácido retinoico”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Directora: Ana Aranda. Calificación: Apto “cum laude”

Palabras Clave

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

Función y Regulación de la Expresión de los Genes de la Paramiosina/Miniparamiosina y de la Troponina T en *Drosophila*.

Investigador Principal:	Cervera, Margarita
Investigador Asociado:	Marco, Roberto
Becarios Postdoctorales:	Benoist, Patrick (Marzo,1997)
Becarios Predoctorales:	Arredondo, Juan J.
Colaboraciones:	Bullard, Belinda (EMBL) Fraile, Benito (Univ. Alcala Henares)

Estudio *in vivo* e *in vitro* de los promotores que regulan la expresión del gen de la Paramiosina/miniparamiosina

(J. Arredondo y M. Cervera)

La regulación de la expresión de genes musculares es diferente a la de otros tipos de genes, y el gen de la PM/mPM de *Drosophila* es un buen modelo de estudio para contribuir al esclarecimiento de dicha regulación, tanto en *Drosophila* como en mamíferos. La comparación de las secuencias de los dos promotores de este gen de *D. melanogaster* y *D. virilis* y las análisis *in vivo* en líneas transgénicas nos permite sugerir actualmente que: a) las regiones más proximales, 1kb del promotor de la PM y 0.7 kb del de la mPM, presentan solo los elementos responsables de la transcripción basal; b) las regiones, de alrededor de 1 kb, que le dan especificidad espacio-temporal y de fibra muscular en ambos promotores se encuentran a aproximadamente 1 kb del inicio de la transcripción; c) La inclusión de regiones más 5' a estas producen un incremento progresivo de los niveles de expresión. Esto sugiere que las primeras dan cualidad a la expresión y las segundas cantidad; d) Todas las regiones capaces de dirigir la expresión del gen de la β -galactosidasa de una manera similar a como se expresan las proteínas endógenas se encuentran en las regiones 5' del gen. La única diferencia reside en la expresión del gen en los principales músculos torácicos. En estos músculos la expresión del gen bacteriano conducida por ambos promotores esta invertida con respecto a la de las proteínas endógenas. Así la mPM se expresa mayoritariamente en los músculos de salto mientras que la PM lo hace en los músculos de vuelo. Los resultados sugieren que los dos promotores del gen actúan de manera coordinada, al menos para los músculos torácicos

Estudio de la expresión específica de tipo de músculo en el gen de la Troponina T de *Drosophila*. Análisis del promotor.

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

El gen de la Tn T presenta un primer exon no traducido, un microexon de 3 pares de bases (el exon más pequeño hasta ahora descrito) y dos sitios de poliadenilación. Se han identificado cuatro mRNAs con especificidad de tipo muscular: hipodérmicos de adultos, hipodérmicos de larvas y viscerales, conducto dorsal y músculos de vuelo y salto. Los dominios centrales de interacción de la TnT con los otros miembros del complejo (tropomiosina, Tn I y C) están muy conservados. La variabilidad generada por procesamiento alternativo en la región NH₂-terminal le da especificidad de tipo muscular. La importante variabilidad del COOH-terminal se asocia a un grupo filogenético .

En el gen de la TnT un solo promotor controla la expresión de los cuatro mRNAs específicos. Se ha empezado la caracterización de las regiones promotoras que controlan su expresión lo que nos va a permitir identificar los motivos y los factores de transcripción implicados en su control. El estudio inicial está centrado en delimitar las regiones que controlan la expresión de este gen. Este gen, presenta un primer intron anormalmente grande para *Drosophila* (2.3 kb). Datos preliminares indican que en el intron existen regiones funcionalmente importantes. Por ello nos hemos centrado en buscar estas regiones en la región

5' del gen y en el intron.

Publicaciones

- Maroto, M., Arredondo, J. J., Goulding, D., Marco, R., Bullard, B. y Cervera, M. (1996) *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity, localization and isoform pattern: A possible role in muscle maturation and function. *J. Cell Biol.* 134, 81-92.
- Royuela, M., Garcia-Anchuelo, R., Arenas, M. I., Cervera, M., Fraile, B. y Paniagua, R. (1996). Immunocytochemical electron microscopic study and western blot analysis of paramyosin in different invertebrate muscle cell types of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the earthworm *Eisenia foetida* and the snail *Helix aspersa*. *Histochem. J.* 28, 247-255.
- Royuela, M., Fraile, B., De Miguel, M. P., Cervera, M. & Paniagua, R. (1996). Immunochemical study and western blotting analysis of titin-like proteins in the striated and smooth muscle of the oligochaete *Eisenia foetida*. *Microscopy Res. and Technique* 35, 349-356.
- Royuela, M., Fraile, B., Cervera, M. & Paniagua, R. (1997). Immunocytochemical electron microscopic study and Western blot analysis of myosin, paramyosin and miniparamyosin in the striated muscle of *Drosophila melanogaster* and in obliquely striated and smooth muscles of the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18, 167-177

Palabras clave

Control de expresión, músculo, *Drosophila*.

Caracterización de Nuevos Genes Humanos y su Posible Implicación en Enfermedades Hereditarias.

Investigadores Principales: Cruces, Jesús, Profesor Titular UAM
 Coloma, Antonio Profesor Titular UAM

Ver el resumen correspondiente en la sección del Departamento de Enzimología y Patología Molecular, página 83

Regulación de la expresión de los genes mitocondriales

Investigador principal: García Vallejo, Carmen, Colaborador Científico
Personal de Apoyo: Seguido de la Fuente, Ana M^a
Colaboraciones: Rodríguez-Peña, Angeles, IIB

Purificación y clonaje de la poli(A) polimerasa mitocondrial

(C.G. Vallejo y A. M. Seguido)

No se conoce nada sobre los mecanismos de control postranscripcional relativos a la poliadenilación de los RNAs mitocondriales, a pesar de que estos RNAs están poliadenilados y ya se han caracterizado a nivel molecular otros componentes de la maquinaria de expresión mitocondrial. Por lo tanto, debe existir una poli A polimerasa mitocondrial. Nuestro objetivo es purificar esta proteína para poder clonarla y secuenciarla posteriormente. Puesto que la proteína debe ser escasa será necesario partir de grandes cantidades de material biológico y, en este sentido, *Artemia* parece conveniente ya que los embriones se pueden obtener sin limitaciones. La proteína, por otra parte, debe estar conservada por lo que no debe ser un inconveniente el purificarla en *Artemia*. Hemos detectado una actividad enzimática en mitocondrias purificadas que incorpora residuos de ácido adenílico en RNA y tenemos una caracterización inicial que indica que la poli A polimerasa mitocondrial es diferente de la descrita en el citoplasma/núcleo.

Análisis de los transcritos de factores de transcripción implicados en la expresión génica mitocondrial

(C.G. Vallejo, A. Rodríguez-Peña)

En mitocondrias de mamíferos se ha descrito un único factor de transcripción mitocondrial codificado en el núcleo, mtTFA. La expresión de este factor depende de dos factores de transcripción, los factores respiratorios nucleares NRF-1 y NRF-2. Diferentes genes mitocondriales codificados en el núcleo dependen también en su expresión de uno u otro de estos factores. Con el objeto de tener una imagen integrada del papel que estos factores tienen en los diferentes niveles de expresión de los genes mitocondriales en distintos tejidos, hemos estudiado los patrones de expresión y los niveles que estos factores de transcripción alcanzan en tres tejidos de la rata: hígado, cerebro y testículos.

Publicaciones

- Vallejo, C. G., López, M., Ochoa, P., Manzanares, M. and Garesse, R. (1996). Mitochondrial differentiation during the early development of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochem. J.* 314, 505-510.
- Vallejo, C. G., Seguido, A. M. and Fernández-Renart, M. (1997). Protein Kinases in mitochondria of the invertebrate *Artemia franciscana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 9-16.
- Garesse, R., Carrodegua, J. A., Santiago, J., Pérez, M. L., Marco R. and Vallejo, C. G. (1997). *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B, 357-366.
- Carrodegua, J. A. y Vallejo, C. G. (1997). Mitochondrial transcription initiation in the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.*, 250, 514-523

Palabras clave

Mitocondria, expresión génica, DNA mitocondrial, RNAs mitocondriales, β -ATPasa, enzimas mitocondriales, transcripción, promotores mitocondriales, RNA 12S, proteína kinasas mitocondriales, factores de transcripción, *Artemia franciscana*.

Fisiopatología de la biogénesis mitocondrial

Investigador principal:	Garesse, Rafael, Profesor Titular UAM
Investigadores asociados:	Bornstein, Belén, Médico especialista en Bioquímica Clínica, Hospital Severo Ochoa. Leganés Fernandez, Miguel A. (desde Marzo 1997), Profesor Ayudante LRU
Colaboraciones:	Arenas, Joaquin, Adjunto de Bioquímica Clínica Hospital 12 de Octubre. Madrid Marco, Roberto, Depto. Bioquímica UAM
Becarios postdoctorales	Lefai, Etienne (desde Abril 97)
Becarios predoctorales:	Talamillo, Ana (Enero 96 - Febrero 97) Ruiz, Inmaculada (Enero 96 - Febrero 97) Ugalde, Cristina
Personal de apoyo:	Ochoa, Pilar

Biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster*

(A. Talamillo, I. Ruiz de Mena, C. Ugalde, E. Lefai, M.A. Fernandez, B. Bornstein, P. Ochoa, R. Marco y R. Garesse)

La biogénesis mitocondrial es un proceso básico para la fisiología celular que requiere la expresión coordinada de dos genomas localizados en compartimentos física y genéticamente diferentes, el mitocondrial y el nuclear. Ello exige la puesta en marcha de un complejo programa de expresión génica que debe modularse en función de las necesidades energéticas de los diferentes tejidos y responder a un número variado de señales fisiológicas, incluyendo las producidas durante el desarrollo embrionario o la respuesta a hormonas. A pesar de su importancia central a nivel celular los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis de mitocondrias animales son aún muy mal conocidos. En nuestro grupo estamos utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo con objeto de modificar *in vivo* la replicación del DNA mitocondrial y caracterizar factores de transcripción relevantes para el programa de diferenciación mitocondrial. Hemos clonado y caracterizado una serie de genes que desempeñan funciones importantes en estos procesos: las dos subunidades de la γ -polimerasa, dos subunidades de la ATP sintetasa (α y β) y la δ -aminolevulinato sintetasa, el enzima clave en la biosíntesis del grupo hemo. Mediante la utilización de una combinación de técnicas *in vitro* e *in vivo* estamos caracterizando sus regiones promotoras e identificando los factores que regulan su expresión. Por otro lado, mediante la utilización de líneas de *Drosophila* que expresan el factor de transcripción GAL4 estamos sobreexpresando las dos subunidades de la γ -polimerasa con objeto de alterar la replicación y generar mutantes con defectos moleculares similares a los detectados en las citopatías humanas de origen mitocondrial.

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 como correlacionan las diferentes mutaciones con los fenotipos que originan. Nuestro grupo está colaborando con el 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^{Lys}. Hemos demostrado su patogenicidad mediante PCR en fibra aislada y realizado un estudio en células ρ^0 , obteniendo clones cíbridos homoplásmicos para una o las dos mutaciones. En la actualidad estamos estudiando la patogenicidad de nuevas mutaciones, y utilizando diversas estrategias experimentales destinadas a caracterizar las alteraciones moleculares que las mutaciones provocan a nivel celular.

Publicaciones

- Garesse R y Marco R (1996). El envejecimiento, un fenómeno biológico intrigante. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología* **13**, 38-41.
- Vallejo CG, López M, Ochoa P, Manzanares M and Garesse R (1996). Mitochondrial differentiation during the early development of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem. J.* **314**, 505-510.
- Manzanares M, Williams T, Marco R and Garesse R (1996). Segmentation in the crustacean *Artemia*: engrailed staining studied with an antibody raised against the *Artemia* protein. *Roux'Arch. Dev. Biol.* **205**, 424-431.
- Benguria A, Grande E, de Juan E, Ugalde C, Miquel J, Garesse R and Marco R (1996). Microgravity effects on *Drosophila melanogaster* behavior and aging. Implications of the IML-2 experiment" *J. Biotechnol.* **47**, 191-201.
- Anthony P, Ausseil J, Bechler B, Benguria A, Blackhall N, Briarty LG, Cogoli A, Davey MR, Garesse R, Hager R, Loddenkemper R, Marchant R, Marco R, Marthy HJ, Perry M, Power JB, Schiller P, Ugalde C, Volkmann D, and Wardrop J (1996). Preservation of viable biological samples for experiments in space laboratories. *J Biotechnol.* **47**, 377-393.
- Garesse R, Carrodegua JA, Santiago J, Pérez ML, Marco R and Vallejo CG (1997). *Artemia* mitochondrial DNA: molecular biology and evolutive considerations" *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **117**, 357-366

Tesis Doctorales

- Ana Talamillo Cancelo
Caracterización del gen que codifica la subunidad α de la H⁺ ATP sintetasa de *Drosophila melanogaster*. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de ciencias. 1997.
Director: Rafael Garesse. Calificación: apto "cum laude".

Palabras clave

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

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

Investigador principal:	Marco, Roberto, Catedrático UAM
Investigadores asociados:	Garesse, Rafael, Profesor Titular UAM Cervera, Margarita, Profesora Titular UAM
Becarios Predoctorales:	Mas, José Antonio, Díaz, Carlos (desde Octubre 1996)
Investigadores visitantes:	Hernandorena, Arantxa (Laboratoire du Museum National d'Histoire Naturelle, Biarritz, Francia. Tapia, Lucia (ICC, Universidad de Chile, Enero-Marzo de 1996)
Colaboraciones:	Medina, Javier, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Cantón, Emilia, Servicio de Microbiología Experimental, Hospital la Fe, Valencia. Gobernado, Miguel, Jefe de Servicio de Microbiología, Hospital la Fe, Valencia. de Juan, Emilio, Depto. de Biotecnología, Universidad de Alicante.
Apoyo a la investigación	Villa, Aida Cabrero, Sofía (hasta Junio 1996)

Purificación y Propiedades de las Troponinas en *Drosophila* y otros artrópodos.

(R. Marco, Carlos Díaz, J. A. Mas, Lucia Tapia y M. Cervera)

Dentro de un proyecto 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, y hemos 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 y los hemos extendido a la Troponina C. 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 purificado distintas preparaciones de Troponinas T y C para reexaminar las propiedades de unión a Calcio de estas proteínas.

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, C. Díaz, A. Hernandorena, E. de Juan 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 anteriores se confirmó y extendió la información que teníamos sobre el comportamiento de

estos procesos biológicos en el espacio. En Otoño de 1997 se ha realizado una nueva serie de experimentos en el satélite ruso Fotón 11 que se encuentran actualmente en fase de análisis. Se ha puesto en marcha una línea de investigación relacionada en colaboración con el Dr. Javier Medina del Centro de Investigaciones Biológicas para adaptar los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas a las condiciones especiales que tendrán que hacer frente los experimentos biológicos en la futura Estación Espacial Internacional.

Aplicaciones de las Microondas a la Tecnología Biológica.

(R. Marco, J. A. Mas, S. Cabrero, F. J. Medina, 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, Fr. Amat, Fr. Hontoria, 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 de forma simpátrica con las cepas partenogénéticas diploides comparten el DNA mitocondrial con las cepas bisexuales de China, mientras que las diploides lo hacen con las cepas bisexuales de Asia Occidental y Central. El estudio de las características morfológicas mediante funciones discriminantes permite identificar una zona de hibridación situada en el Centro de Asia extendiendo a este grupo de invertebrados la evidencia de que las poblaciones partenogénicas se originan en zonas de hibridación como estas.

Publicaciones.

Marco, R. (1996). 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, 243-248.

Marco, R., Benguría, A., Sánchez, J., & E. de Juan (1996). Effects of the Space Environment on *Drosophila melanogaster* Development. Implications of the IML-2 Experiment. *J. Biotechnol.* 47, 179-190.

Benguría, A., Grande, E., de Juan, E., Ugalde, C., Garesse, R. & R. Marco (1996). Microgravity Effects on *Drosophila melanogaster* behavior and aging. Implications of the IML-2 Experiment. *J. Biotechnol.* 47, 191- 202.

Anthony, P., Ausseil, J., Bechler, B., Benguría, A., Blackhall, N., Briarty, L. G., Cogoli, A.,

- Davey, M. R., Garesse, R., Hager, R., Loddenkemper, R., Marchant, R., Marco, R., Marthy, H. J., Perry, M., Power, J. B., Schiller, P., Ugalde, C., Volkmann, D. & J. Wardrop (1996). Preservation of viable Biological Samples for experiments in Space Laboratories" J. Biotechnol. 47, 377-393.
- Manzanares, M., Williams, T., Marco, R. & R. Garresse (1996). Segmentation in the crustacean *Artemia* as revealed by engrailed protein distribution. Wilhelm Roux's Archiv. 205, 424-431
- Maroto, M., Arredondo, J., Goulding, D., Marco, R., B. Bullard & M. Cervera (1996). *Drosophila* Paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity, localization and isoform pattern: A possible role in muscle maturation and function. J Cell Biol. 134, 81-92
- Garesse, R. & R. Marco (1996). El envejecimiento, un fenómeno biológico intrigante. Fronteras de la Ciencia y la Tecnología 13, 38-41.
- Garesse, R., Santiago, J., Pérez, M. L., Marco, R. & C. G. Vallejo (1997). *Artemia* mitochondrial DNA: Molecular biology and Evolutive considerations. Comp. Biochem. Physiol. 117B, 357-366.
- Marco, R. (1997). Investigation of the Mechanisms Involved in the Effects of Space Microgravity on *Drosophila* Development, Behavior and aging (*Drosophila*). Second International Microgravity Laboratory (IML-2) Final Report. NASA Reference publication 1405 pp. 136-137. Marshall Space Flight Center, Alabama.

Palabras clave

Drosophila, *Artemia*, Troponina T, Troponina C, Músculo, Mitocondria, Envejecimiento, Microgravedad, Espacio, Microondas.

Regulación de la expresión del gen de la Proteína amiloide

Investigador Principal:	Pascual, Angel, Investigador Científico
Becarios Posdoctorales:	Belandia, Borja
Becarios Predoctorales:	Villa, Ana Ruiz, Yolanda
Técnico en formación:	Fernández, Isabel

La proteína b-amiloide (AP) es el componente mayoritario de los depósitos cerebrales que se observan en la enfermedad de Alzheimer. Esta proteína de 39-43 aminoácidos se genera inicialmente incorporada en una proteína precursora (APP) de la que se conocen diferentes isoformas, todas ellas derivadas, mediante procesamiento alternativo, de un único gen localizado en el cromosoma 21. La sobre-expresión de esta proteína precursora altera su propio procesamiento, incrementando la formación de fragmentos amiloidogénicos, y se asocia con un aumento de la neurotoxicidad. En definitiva la producción excesiva de APP podría considerarse un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Ligandos de receptores de membrana con actividad tirosina kinasa y de receptores de la superfamilia de receptores nucleares parecen jugar, al igual que la propia proteína b-amiloide, un papel en la regulación de la expresión del gen de la APP. Los mecanismos moleculares que median la regulación de APP por dichos ligandos, son prácticamente desconocidos y su estudio, en células de origen neural, será el tema central a desarrollar en el presente proyecto. Estos efectos podrían estar mediados a través de secuencias comprendidas en la región 5' reguladora del gen, y por ello se analizarán las secuencias del promotor implicadas en la regulación por estos ligandos. El promotor humano contiene sitios consenso para la unión específica de distintos factores de transcripción, entre otros dos sitios AP-1, cuya participación en la regulación será igualmente objeto de estudio en el presente proyecto.

Publicaciones

Pascual A (1996). La Enfermedad de Alzheimer. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología* 13, 25-27

Cosgaya JM, Latasa MJ, and Pascual A (1996). Nerve growth factor and Ras regulate β -amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* 67, 98-104

Tesis doctorales

Maria Jesús Latasa Sada.

“Expresión y regulación del gen de la proteína β -amiloide en células de feocromocitoma (PC12) y neuroblastoma (SH-SY5Y y N2A)”. Universidad de Alcalá. Facultad de Farmacia. 1997. Director: Angel Pascual. Calificación: Apto "Cum Laude"

Palabras clave

Enfermedad de Alzheimer, Células en cultivo, Expresión génica, Hormonas, Factores de crecimiento.

Regulación por hormona tiroidea de la expresión génica durante el desarrollo.

Investigador principal:	Pérez-Castillo, Ana, Colaborador Científico
Investigador asociado: Fac.Medicina, UCM)	Santos, Angel (Dpto.Bioquímica y Biología Molecular,
Becarios predoctorales:	Vega-Nuñez, Elena (hasta Noviembre 1996) Menéndez-Hurtado, Ana De Diego, Fátima (desde Septiembre 1997) Pignatelli, Miguel (desde Septiembre 1997) Alvarez, M ^a del Mar (desde Septiembre 1997)
Colaboraciones:	Zorzano, Antonio (Depto. de Bioquímica, Facultad de Biología, U. de Barcelona). Alvarez, Alberto (Unidad de Citometria de Flujo, Fac. de Farmacia, UCM). Lai, Cary (Dept. of Neuropharmacology, The Scripps Research Institute, San Diego, CA, EEUU).

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

(A.Perez Castillo, A.Santos, E.Vega-Núñez, Fátima de Diego y Alberto Alvarez).

Un desarrollo correcto del Sistema Nervioso Central requiere un estado tiroideo normal. En humanos, la deficiencia de hormona tiroidea (T3) está asociada con un profundo retraso mental y graves problemas neurológicos como sordera y descoordinación motora. También, el hipotiroidismo experimental en la rata produce un desarrollo anormal del cerebro con trastornos tales como una disminución en la conectividad interneuronal, una mielinización retrasada, defectos en la migración celular y alteraciones en los niveles de neurotransmisores. La regulación de la termogénesis, a través de la regulación de la actividad mitocondrial, es uno de los efectos clásicos de la T3. Hasta muy recientemente se ha considerado que esta hormona tenía este efecto en tejidos como hígado, riñón y músculo esquelético, pero no que carecía de efecto alguno sobre la actividad mitocondrial en cerebro. Nosotros hemos encontrado una disminución significativa de la expresión génica mitocondrial en el cerebro de neonatos hipotiroideos asociada con una menor actividad de la citocromo c oxidasa. Estos datos los hemos ampliado recientemente con estudios de morfología y funcionalidad de la mitocondria. Para ello analizamos el funcionamiento de la cadena de transporte, localizada en la membrana interna mitocondrial, mediante la medida de la diferencia de potencial generada a ambos lados de la membrana interna mitocondrial utilizando el colorante lipofílico rodamina-123. Este fluorocromo se acumula específicamente en la mitocondria a través de un mecanismo que depende del potencial de membrana y, por tanto, este puede determinarse mediante la cuantificación de la fluorescencia asociada a rodamina. Análisis de citometría de flujo mostraron que en las mitocondrias de cerebro aislado de animales hipotiroideos captaban solamente el 61% de la rodamina-123 captada por las mitocondrias de animales eutiroideos. Esta bajada se revierte a las 48 horas de la administración de T3, pero no a las 2 horas, sugiriendo que las alteraciones funcionales observadas son la consecuencia de cambios en la expresión génica mitocondrial. Este efecto se observó tanto en mitocondrias en condiciones basales como estimuladas con substratos. El estudio morfológico (microscopía electrónica) mostró que la morfología de las mitocondrias neuronales de corteza cerebral, estriado e hipocampo (exceptuando la capa CA1) de animales hipotiroideos está gravemente alterada, presentando una marcada disminución en el área de la membrana interna. Estos cambios no se observan en células de glía. Estos resultados muestran por tanto que la T3 es un importante regulador de la función mitocondrial neuronal en el cerebro en desarrollo.

En cuanto al mecanismo molecular de acción de T3 sobre la mitocondria neuronal, pensamos que debe existir un mediador entre el núcleo y la mitocondria, ya que la mayoría de

los efectos de T3 son mediados a través de su unión a receptores nucleares. Los candidatos más obvios para este papel de mediador son el factor de transcripción mitocondrial mtTFA (sintetizado en el genoma nuclear) y los otros dos factores nucleares identificados, NRF-1 y NRF-2, que coordinan en el núcleo la expresión de secuencias que codifican para proteínas mitocondriales e incluso el propio mtTFA. Para averiguar por tanto si alguno de estos factores estaba bajo el control de T3 hemos aislado un fragmento de 1.2 kb del promotor del mtTFA y hemos estudiado su regulación. Estudios de transfección junto con el receptor TR β de T3 y la proteína auxiliar RXR, en células de neuroblastoma, indican que T3 induce 4-5 veces la actividad basal de dicho promotor. Este promotor se estimula también por dos factores de transcripción cuya expresión es dependiente de T3: Egr1 y C/EBP, por lo cual el factor mtTFA podría estar regulado por esta hormona tanto de una forma directa como indirecta a través de estos factores.

Regulación por hormona tiroidea y ácido retinoico de la expresión de los genes C/EBP α y C/EBP β durante el desarrollo hepático

(A.Perez-Castillo, A.Santos, A. Menendez-Hurtado)

Las proteínas C/EBPs (CCAAT enhancer binding proteins) son una familia de factores de transcripción caracterizados por tener un dominio conservado de cremalleras de leucina que les permite formar homodímeros y heterodímeros entre ellos. Estas proteínas están implicadas en la función y diferenciación de gran variedad de células, entre ellas adipocitos, hepatocitos y monocitos. Ya que la T3 tiene un papel muy importante en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos en hígado y tejido adiposo y se sabe también que las proteínas C/EBP están implicadas en la regulación transcripcional de muchos genes relacionados con estos procesos, estudiamos si esta hormona podría ejercer en parte su acción sobre dicho metabolismo a través de su control de estas proteínas. Para ello hemos determinado el contenido de mRNA y proteína C/EBP α y β , durante el desarrollo, en hígado de animales eutiroides, hipotiroideos e hipotiroideos inyectados con T3. El hipotiroidismo congénito causa una disminución significativa en la concentración de mRNA, α y β , en estadios tempranos del desarrollo postnatal. Este efecto es específico de tejido ya que la T3 no regula las C/EBPs en grasa parda. La administración de T3 a neonatos hipotiroideos provoca una recuperación relativamente lenta de los niveles hepáticos de ambos mRNAs. Cuando medimos los niveles de proteína encontramos que los niveles de C/EBP α y C/EBP β eran claramente inferiores en los neonatos hipotiroideos comparados con eutiroides y que su respuesta a T3 era más rápida que la que presentaban los mRNAs sugiriendo en parte un control a nivel de traducción de estos genes por T3. Sin embargo, en experimentos preliminares de transfección con el promotor de C/EBP α hemos encontrado una estimulación de su expresión por T3, lo cual implicaría una regulación directa de este gen. Todo ello sugiere una regulación muy compleja de los genes C/EBP por T3. Por otro lado, el ácido retinoico es un estimulador de la expresión de estos genes más rápido y con un mayor efecto que la T3.

Papel de las neuregulinas como posibles receptores celulares

(A.Perez Castillo, Angel Santos, C.Lai, M.Pignatelli).

Las neuregulinas (NRGs) son un grupo de proteínas, solubles o de membrana, relacionadas entre sí estructuralmente cuyos receptores son tirosinas kinasas de la familia de los ErbBs. Estas proteínas tienen una zona extracelular que contiene un dominio similar al EGF la cual es suficiente para unirse a los ErbBs y estimular las respuestas celulares. Estas neuregulinas han recibido diferentes nombres: heregulina, NDF (neu differentiation factor), GGF (glial differentiation factor) y ARIA (acetylcholine receptor inducing activity) y son diferentes productos de corte y empalme del mismo gen, aunque recientemente se han clonado dos nuevas neuregulinas codificadas por genes diferentes, NRG2 y NRG3. Las neuregulinas están implicadas en un complejo sistema de señalización que regula diferenciación, proliferación y apoptosis. Algunas neuregulinas tienen una estructura en varios dominios: un dominio

extracelular, uno de transmembrana y un dominio intracelular. Ya que esta estructura recuerda a la de receptores celulares decidimos estudiar si efectivamente estas proteínas, aparte de su papel como ligandos, podrían funcionar como receptores de membrana. Para ello hemos generado líneas celulares estables sobreexpresando NRG1 y NRG2. Entre las diferentes líneas celulares que probamos elegimos unas células gliales generadas a partir de un cultivo primario de oligodendrocitos (OM5) y también células PC12 y seleccionamos diferentes clones de ambos tipos celulares los cuales se chequearon utilizando anticuerpos específicos contra ambas neuregulinas. Lo primero que hicimos fue estudiar si la región citoplasmática de estas neuregulinas era susceptible de fosforilarse cuando las células eran estimuladas con suero. Estos experimentos mostraron que la región citoplasmática de ambas neuregulinas es efectivamente capaz de fosforilarse por algún factor o factores presentes en el suero. Esto sugiere que estas proteínas podrían estar realizando una función receptora en alguna ruta de transducción de señales. Para averiguar si el contacto con el receptor, ErbBs, también regulaba la fosforilación de las neuregulinas, incubamos células sin transfectar así como células transfectadas con las neuregulinas con proteínas de fusión ErbB4 que consistían en el dominio extracelular del ErbB4 fusionado a la porción Fc de la inmunoglobulina G. Aunque probamos a diferentes tiempos de estimulación hasta 60 minutos, no pudimos encontrar fosforilación de las neuregulinas inducida por los homodímeros ErbB4/ErbB4. Estos experimentos pensamos repetirlos con otras combinaciones de heterodímeros. Todos estos datos apuntan a la idea de que las neuregulinas podrían actuar como receptores transmitiendo señales extracelulares al interior de la célula, si estas señales se originan por la unión de los propios ErbBs o no, es algo que pensamos analizar en un futuro inmediato.

Publicaciones.

- Moreno, B., Rodríguez-Manzanique, JC., Pérez-Castillo, A and Santos, A. (1997). Thyroid hormone controls the expression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene at different levels in lung and heart of developing and adult rats. *Endocrinology* 138, 1194-1203.
- Menéndez-Hurtado, A., Vega-Núñez, E., Santos, A. and Pérez-Castillo, A. (1997). Regulation by thyroid hormone and retinoic acid of the CAAT/Enhancer binding protein alpha and beta genes during liver development. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 234, 605-610.
- Vega-Núñez, E., Alvarez, AM., Menéndez-Hurtado, A., Santos A., and Pérez-Castillo, A. (1997). Neuronal mitochondrial morphology and transmembrane potential are severely altered by hypothyroidism during rat brain development. *Endocrinology* 138, 3771-3778.

Tesis Doctorales

Elena Vega Nuñez

"Regulación por hormona tiroidea de la expresión del genoma mitocondrial en cerebro durante el desarrollo: Papel en la morfología y funcionalidad mitocondriales". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Directora: Ana Perez Castillo.
Calificación: Apto "cum laude"

Palabras clave

C/EBP, cerebro, desarrollo, hígado, hormona tiroidea, mitocondria, neuregulinas, regulación expresión génica.

Regulación transcripcional durante el desarrollo

Investigador principal:	Sastre, Leandro
Investigador Contratado	Escalante, Ricardo (Desde Marzo de 1997)
Investigador Visitante:	Ortiz-Caro, Javier (Profesor Titular UNED)
Becarias Predoctorales	Casero, Marie-Carmen Martinez, Ana

Estudio de la regulación del gen de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *Artemia franciscana*

(Ana Martinez, Javier Ortiz-Caro, Ricardo Escalante y Leandro Sastre)

El gen que codifica la ATPasa de calcio de retículo sarcoendoplásmico se transcribe en *Artemia franciscana* a partir de dos promotores diferentes. Uno de ellos es específico de músculo mientras que el segundo se utiliza en todos los tejidos del animal. Estamos estudiando estos dos promotores para identificar sus regiones reguladoras y los factores que controlan su expresión. Algunos de estos estudios se están realizando mediante ensayos de expresión transitoria en células en cultivo usando el gen de la luciferasa como testigo. Hemos ensayado varias líneas de células de mamífero y una de *Drosophila*. Se ha podido detectar una región estimuladora de la transcripción en el segundo promotor, que estamos tratando de caracterizar en la actualidad. Análisis similares del primer promotor no han permitido detectar ninguna región reguladora puesto que los distintos fragmentos del promotor ensayados tienen la misma actividad transcripcional. También estamos realizando ensayos de protección a DNasa I por extractos de quistes o nauplias de *Artemia*. Mientras que los extractos de nauplias protegen varias regiones de ambos promotores, los de quistes no protegen ninguna región. Estos datos sugieren la ausencia de uno o varios factores de transcripción en los quistes, hipótesis que estamos tratando de corroborar.

Regulación de la transcripción de genes de actina de *Artemia franciscana*

(Marie-Carmen Casero, Javier Ortiz-Caro, Leandro Sastre)

En años anteriores habíamos aislado tres genes que codifican diferentes isoformas de actina en *Artemia*. Una de ellas es muscular, las otras dos se expresan en todos los tejidos (isoformas citoplásmicas). Los promotores de estos tres genes también se habían aislado y se están caracterizando en la actualidad. Los métodos de estudio empleados son similares a los descritos en la sublínea anterior. Los resultados obtenidos en los estudios de protección a DNasa I con extractos de quistes y nauplias de *Artemia* también son similares: los extractos de nauplias protegen distintas regiones de los tres promotores y los de quistes no, apoyando la hipótesis formulada anteriormente. Los estudios de expresión transitoria han detectado sendas regiones estimuladoras de la transcripción en los promotores de las actinas 302 (muscular) y 403 (citoplásmica). En el caso de la isoforma 403, la región reguladora contiene una secuencia idéntica a un elemento de respuesta a suero (SRE), el cual se ha comprobado que es esencial para estimular la transcripción en células en cultivo. Oligonucleótidos con la secuencia de esta región del promotor de *Artemia* son reconocidos por el factor de transcripción de respuesta a suero (SRF) de células de mamífero. La aparente relevancia del factor de respuesta a suero en la actividad del promotor de actina 403 nos ha llevado a tratar de estudiar su homólogo en *Artemia*. Utilizando una sonda de *Drosophila* hemos podido aislar clones de cDNA de *Artemia* que codifican una proteína homóloga al factor SRF y que nos permitirá estudiar el papel de este factor en la regulación de la transcripción durante el desarrollo.

Función del homólogo del factor de transcripción de respuesta a suero (SRF) en *Dictyostelium discoideum*

El factor de transcripción que media la respuesta a suero (SRF) pertenece a una familia de proteínas muy conservada durante la evolución. Dentro de esta familia, la subfamilia a la que pertenece SRF está particularmente conservada en el reino animal. Sin embargo, la función de estos factores de transcripción no parece estar tan conservada. En mamíferos, por ejemplo, SRF se expresa en múltiples tejidos y media la respuesta a factores de crecimiento presentes en el suero. En *Drosophila*, en cambio, se expresa de forma específica de tejido y participa en procesos de especificación o diferenciación de células de las traqueas y del espacio intervenoso de las alas. La reincorporación de Ricardo Escalante, que ha adquirido amplia experiencia en el manejo de *Dictyostelium discoideum* durante su estancia en el laboratorio del Dr. Loomis, nos ha permitido comenzar el estudio de la posible presencia y función del homólogo de SRF en este sistema. Utilizando oligonucleótidos degenerados hemos amplificado por PCR una región de *D. discoideum* con elevada homología al SRF de vertebrados e insectos. Posteriormente hemos aislados los correspondientes clones de cDNA. El homólogo de SRF se expresa únicamente durante el proceso de diferenciación de *D. discoideum*. Mas concretamente durante la fase final del proceso, en la región que da lugar a las esporas. La función de este factor se ha estudiado mediante experimentos de interrupción génica por recombinación homóloga. Las cepas de *D. discoideum* que tienen interrumpido el gen homólogo a SRF presentan un desarrollo morfológicamente normal pero dan lugar a esporas deformes cuya viabilidad está muy reducida. Estos resultados parecen indicar que en *D. discoideum* el factor SRF esta relacionado con procesos de diferenciación. Abre, además, un campo de investigación para estudiar la regulación del factor de transcripción SRF y su función en *D. discoideum*.

Publicaciones

- Escalante, R. y Sastre, L. (1996). Tissue-specific expression of two *Artemia franciscana* sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase isoforms. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 321-325.
- Ortega, M-A., Díaz-Guerra, M. y Sastre, L. (1996). Actin gene structure in two *Artemia* species, *A. franciscana* and *A. parthenogenetica*. *J. Mol. Evol.* 43, 224-235.
- Martínez-Lamparero, A., Casero, M.C., Ortiz-Caro, J. y Sastre, L. (1996). Transcriptional regulation during the activation and development of *Artemia franciscana* encysted embryos. *Int. J. Develop. Biol, Supl.* 1, 91S-92S.
- García-Sáez, A., Perona, R. y Sastre, L. (1997). Polymorphism and structure of the gene coding for the alpha1 subunit of the *Artemia franciscana* Na/K ATPase. *Biochem. J.* 321, 509-518.

Palabras clave

Actina, *Artemia*, ATPasa, desarrollo, *Dictyostelium discoideum*, promotores, SRF, transcripción.

Departamento de Señalización Celular

Papel de la quinasa Akt en la supervivencia neuronal inducida por neurotrofinas y receptores acoplados a proteínas G triméricas.

Investigador principal: Cuadrado, Antonio, Profesor Titular UAM

En el sistema nervioso existe un sofisticado equilibrio entre señales de apoptosis y de supervivencia que condicionan su desarrollo embrionario y su respuesta a factores de estrés. La Ser/Thr quinasa Akt, recientemente caracterizada, parece ser un elemento clave en la transducción de estas señales. Sirviéndonos de nuestra experiencia en segundos mensajeros lipídicos y en transducción de señales por otras quinasas hemos iniciado una nueva línea de investigación en la que estudiaremos la implicación de Akt en la señalización por receptores de NGF, con actividad proteína tirosina quinasa, y por receptores muscarínicos, acoplados a proteínas G triméricas. Además analizaremos los mecanismos efectores de Akt relacionados con el metabolismo de la esfingomielina e intentaremos clonar y caracterizar los substratos relevantes para su función antiapoptótica. Estos estudios son de interés en regeneración neuronal y enfermedades neurodegenerativas.

Papel de Akt en la transducción de señales mediadas por el receptor TrkA de NGF.
Activación de Akt en respuesta a NGF. Posible implicación de PI3K.

Papel de Akt en la transducción de señales mediadas por receptores muscarínicos.
Activación de Akt en respuesta a carbacol. Posible implicación de PI3K. Posible implicación de subunidades G $\beta\gamma$. Este estudio se está realizando en colaboración con el laboratorio del Dr. Silvio Gutkind (NIDDR-NIH, Bethesda)

Relación funcional entre Akt y el metabolismo de la esfingomielina. Efecto de la activación e inhibición de Akt sobre los niveles intracelulares de ceramida, esfingosina y esfingosina 1 fosfato en respuesta a señales apoptóticas y de supervivencia.

Búsqueda de substratos de Akt relevantes en su señalización antiapoptótica. Análisis de la posible fosforilación *in vitro* e *in vivo* de proteínas conocidas por su papel en apoptosis. Diseño de una estrategia basada en la técnica de células híbridas de levadura para la identificación de nuevos substratos de Akt.

Palabras clave

AKT, Ser/Thr quinasa, transducción de señales, apoptosis, supervivencia, NGF, trkA, receptores muscarínicos

Regulación Hormonal del Metabolismo.

Investigador principal :	Felú, Juan Emilio, Catedrático UAM y Jefe de Sección de Endocrinología Experimental, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, Madrid.
Investigadores Asociados:	Coloma, Antonio, Profesor Titular UAM Benloch, Teresa, Pediatra Especialista y Doctor Vinculado al Depto. de Bioquímica UAM. Posada de la Paz, Manuel, Jefe de Servicio, Instituto de Salud Carlos III. Garrido, Aurelio, Jefe Adjunto, Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro.
Investigador contratado:	Leal, Almudena Gutiérrez, Julio César (desde agosto 1997).
Becarios predoctorales:	Muñoz, M ^a Josefa (hasta enero 1997). González, M ^a del Carmen Carrillo, Juan José Esteban, Andrés
Personal de apoyo:	García-Ripoll, Isabel

Fisiopatología de la resistencia a insulina a nivel hepático en la rata obesa Zucker (*fa/fa*).

(Juan José Carrillo de la Fuente, Andrés Esteban Gamboa, María del Carmen González Lechuga, María Josefa Muñoz Alonso, Juan Emilio Felú Albiñana).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado resistencia de la gluconeogenesis a la modulación a corto plazo por glucosa e insulina, en hepatocitos aislados de ratas Zucker (*fa/fa*). Tal como demostramos, esta resistencia es en parte debida a la adaptación de los niveles de las actividades glucoquinasa y piruvato quinasa, así como de la concentración de F-2,6-P₂, a la hiperinsulinemia presente en la rata Zucker (*fa/fa*). Esta misma adaptación es también responsable de la resistencia a la acción de las sulfonilureas -hipoglucemiantes orales usados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II y capaces de inhibir la gluconeogénesis hepática- observada por nuestro grupo en hepatocitos aislados de rata obesa. También estamos estudiando la modulación a largo plazo por insulina de los niveles de actividad y mRNA de enzimas claves de la vía glucolítica/ gluconeogénica en cultivos primarios de rata obesa Zucker (*fa/fa*) y de ratas delgadas (*Fa/-*).

Diagnóstico bioquímico y genético-molecular de enzimopatías relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos.

(Teresa Benloch Marín, Isabel García-Ripoll Catalán, Almudena Leal Carrasco, Juan Emilio Felú Albiñana).

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 (galactosemia clásica y deficiencia en galactoquinasa) y sobre intolerancia a la fructosa.

Publicaciones

Sánchez-Gutiérrez, J.C., Sánchez-Arias, J.A., Samper, B. y Felú J.E. (1997). Modulation of epinephrine-stimulated gluconeogenesis by insulin in hepatocytes isolated from genetically obese (*falfa*) Zucker rats. *Endocrinology* 138, 2443-2448.

Tesis doctorales

María José Muñoz Alonso

“Modulación de la actividad glucógeno fosforilasa y de los niveles de Ca^{2+} citosólico por sulfonilureas en hepatocitos aislados de rata y en miocitos BC3H1”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Director: Juan Emilio Felú Albiñana. Calificación: Apto “cum laude”

Juan Carlos del Valle Collado

“Alteración funcional inducida por etanol en un modelo experimental de glándulas gástricas aisladas de conejo”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1996. Codirectores: Irma Rossi Raviolo y Juan Emilio Felú Albiñana. Calificación: Apto “cum laude”

María del Carmen_ González Lechuga

“Resistencia de la gluconeogénesis hepática a la modulación por insulina, glucosa y sulfonilureas en la rata obesa Zucker (*falfa*)”. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 1997. Director: Juan Emilio Felú Albiñana. Calificación: Apto “cum laude”

Palabras clave

Resistencia a insulina , sulfonilureas, hepatocitos, enzimopatías, obesidad.

Mecanismos de transducción de señales por citocinas: prolactina

Investigador principal:	Martín Pérez, Jorge
Becarios postdoctorales:	Fresno, Juan Angel Martinez, Raúl (desde Octubre 1997)
Becarios predoctorales	Carretero, M ^a Victoria (hasta Marzo 1996) Dominguez, Aurora (desde Marzo 1997) Geronimo, Haydee (10 meses en 1996) Pantoja, Cristina (hasta Marzo 1997)

La prolactina (PRL) es un polipéptido de 23 kDa sintetizado y secretado por las células lactotrópas de la hipófisis anterior de todos los vertebrados, y por varios sitios extrahipofisarios como las células deciduales de la placenta, linfocitos y células epiteliales de mama. La PRL ejerce sus múltiples acciones a través de su receptor (PRLR) que se expresa en distintas formas moleculares dependiendo de especie y tejido. Por sus características estructurales los PRLR se encuadran dentro de la familia de receptores de citocinas de clase I homodiméricos. No poseen actividad enzimática, sin embargo, la hormona provoca la asociación y activación de proteínas tirosinas quinasas de las familias Jak y Src con la consiguiente fosforilación en tirosina de proteínas celulares entre las que se encuentra el propio receptor. Es pertinente destacar que por mutaciones en el receptor hemos podido disociar la estimulación de la actividad enzimática de la familia Src de la asociación y activación de las quinasas Jak.

Para comprender la importancia de la fosforilación en tirosina del receptor en la señalización inducida por PRL hemos preparado una serie de mutantes tanto de delección como de sustitución (F/Y) de residuos de tirosina de la forma larga del PRLR de rata. Puesto que hemos observado que la PRL puede inducir proliferación y diferenciación en células del sistema hematopoyético, analizaremos en este modelo la funcionalidad de los mutantes del receptor. Así mismo, gracias al empleo de mutantes quinasa defectivos de la familia Src, estamos estudiando el papel de estas quinasas en la señalización por PRL.

Por último indicar que ante el posible papel de los PRLR y de la familia Src en el cáncer de mama, en colaboración con el Dpto. de Anatomía Patológica del hospital la Paz y de la Unidad de Genética Molecular del hospital Ramón y Cajal, estamos analizando en biopsias tumorales humanas la expresión y funcionalidad de estas moléculas.

Publicaciones

1. Zannini, M., Acebron, A., De Felice, M., Arnone, M. I., Martín-Pérez, J., Santisteban, P., Di Lauro, R. (1996). Mapping and functional role of phosphorylation sites in the thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *J. Biol. Chem.* 271, 2249-2254.

Tesis Doctoral

Juan Angel Fresno Vara.

"Estudio de la asociación y activación de Src por el receptor de prolactina y del papel de Jak 2 en la fosforilación del receptor". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Director: Jorge Martín-Pérez. 1997. Calificación: Acto "cum laude"

Palabras clave

Receptores de prolactina, Src, Jak, fosforilación en tirosina, proliferación/diferenciación celular, expresión génica, cáncer de mama.

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

Investigador Principal:	Renart, Jaime, Investigador Científico del CSIC
Investigadores Asociados:	Behrens, M.Margarita, Profesor Asociado UAM (hasta 1996) Díaz-Guerra, Margarita, Profesor Asociado UAM
Becarios Predoctorales:	García-Gallo, Mónica López, M. Dolores
Alumnos de Licenciatura:	Cejas, Paloma
Personal de Apoyo:	Moratilla, Carmen
Colaboraciones:	Fernández, Margarita, Depto Bioquímica, UAM Montiel, Carmen, Depto Farmacología, UAM

Caraterización de receptores de glutamato tipo NMDA recombinantes producidos mediante el virus de la vacuna.

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

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 ha desarrollado un sistema de expresión de las subunidades NR1 y NR2A basado en el virus de la vacuna. Este sistema de expresión es muy eficiente y produce receptores funcionales, capaces de inducir entrada de Calcio y muerte celular, ambos procesos dependientes de agonistas específicos del receptor y bloqueados por antagonistas. Aunque ambas subunidades están N-glicosiladas, la subunidad NR1 es especialmente sensible al tratamiento con tunicamicina, siendo degradada muy rápidamente; la subunidad NR2A, por el contrario, no se degrada en estas condiciones.

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

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

Cuando células del neuroblastoma N2A se tratan con inhibidores específicos de proteína kinasa C (Bisindolilmaleimida GF109203X y Gö6976 entre otros) se induce un proceso de apoptosis. Hemos caracterizado que este tratamiento elimina totalmente la activación de mas MAPK ERK1 y ERK2 por ésteres de forbol; aunque esta eliminación no es responsable de la apoptosis, ya que inhibición de MAPK por inhibición de MEK no la induce. En las células N2A que sobreexpresan Bcl-2, la inhibición de la PKC alfa con Gö6976 sólo afecta a la actividad basal de las MAPK, mientras que la estimulable no se ve afectada. Sin embargo, este efecto diferencial desaparece si la inhibición se lleva a cabo con GF109203X, inhibidor de todas las isoformas. Estos datos apuntan a un papel específico de la PKC épsilon en las células que sobreexpresan Bcl-2.

Efecto de la Geldanamicina en distintas líneas celulares

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

La Geldanamicina (GA) es un antibiótico cuya diana es la chaperona hsp90, interaccionando econ el sitio del ATP. Esta proteína forma parte de muchos complejos relacionados con la señalización celular: los receptores nucleares, y las proteína kinasas src y

Raf-1 se encuentran en complejos en los que hsp90 está presente. Recientemente se ha demostrado que el tratamiento con GA desestabiliza Raf-1, que se degrada en 24 hr sin afectar a otros miembros de la cascada de quinasas mitogénicas.

Hemos estudiado el efecto de GA en células N2A para ver el efecto de la desaparición de Raf-1 en la apoptosis inducida por inhibición de PKC. Las células N2A tratadas con GA no entran en apoptosis, sino que sufren una diferenciación morfológica, equivalente a la mostrada cuando las células son ayunadas de suero. En este tratamiento, Raf-1 se degrada durante un periodo de 24 hr; sin embargo, se detecta un aumento temporal de la actividad MAPK (máximo hacia las 5 hr) y un posterior declive.

Las células PC12 tratadas con GA mueren por apoptosis a las 24 hr, mientras que las células C2C12 se comportan de manera semejante a las N2A, es decir muestran signos de diferenciación morfológica.

Clonaje de la subunidad alfa-1A de los canales de Calcio tipo P/Q de células cromafines

(grupo de la Dra. Carmen Montiel con la colaboración de Jaime Renart)

Publicaciones

Renart, J., Behrens, M.M., Fernández-Renart, M. and Martínez, J.L. (1996). Immunoblotting Techniques. En "Immunoassays", (Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K., eds.), Academic Press, pp. 537-554.

Martínez, J.L., Behrens, M.M., Moratilla, C., and Renart, J. (1997). Oleoylanilide, a possible causative agent of toxic oil syndrome, interferes with the cytoskeleton in a neuronal cell line. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 147-150.

Montiel, C., Herrero, C.J., García-Palomero, E., Renart, J., García, A.G., and Lomax, R.B. (1997). Serotonergic effects of dotarizine in coronary artery and in oocytes expressing 5-HT₂ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 332, 183-193.

Palabras clave

excitotoxicidad, apoptosis, receptores de glutamato, proteína kinasa C, Bcl2, neuroblastoma, geldanamycin, MAPK, Raf-1

Regulación de la Diferenciación de Células Nerviosas y la Actividad de Promotores Neuro - Específicos por Receptores Nucleares.

Investigador Principal:	Rodríguez-Peña, Angeles, Colaborador Científico
Investigador Contratado:	Barettino, Domingo (hasta Octubre 1996)
Becarios Postdoctorales:	Escrivá, Hector (desde Enero 1997) Pastor, Rosa M ^a
Becarios Predoctorales:	Ibarrola, Nieves (hasta Enero 1997) Martínez, Pilar Vega, Sonia Espliguero, Gemma (desde Octubre 1997)

Regulación de la diferenciación de oligodendrocitos.

(N. Ibarrola, S. Vega y A. Rodríguez-Peña)

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.

Control de la proliferación y la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos por la hormona tiroidea.

(S. Vega y A. Rodríguez-Peña).

Existen varias isoformas del receptor de hormona tiroidea, algunas muy abundantes en el sistema nervioso central y cuyo patrón de expresión durante el desarrollo es bastante diferente. Los precursores de oligodendrocitos expresan las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Cuando se diferencia a oligodendrocitos expresan también la isoforma $\beta 1$. Se ha sugerido que cada isoforma puede ser responsable de diferentes acciones de la hormona tiroidea. Utilizando vectores retrovirales que codifican para las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ hemos demostrado que la expresión de la isoforma $\beta 1$ inhibe la respuesta proliferativa, de una forma más potente que lo hace la isoforma $\alpha 1$, y este efecto parece ser debido al incremento del inhibidor p27/Kip1. Hemos demostrado que se pueden disociar el efecto antiproliferativo de la hormona tiroidea de su efecto en la diferenciación.

Busqueda de genes directamente regulados por T3 en los precursores de oligodendrocitos.

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

Utilizando la técnica de PCR-display hemos comenzado a buscar genes regulados directamente por T3 en los precursores de oligodendrocitos, utilizando cultivos primarios puros de células O-2A que han estado expuestas a T3 por unas horas. Esta técnica ya ha sido puesta a punto en el laboratorio. Su aplicación a la búsqueda de genes regulados por T3 neuroblastomas, ha generado 13 posibles candidatos cuya expresión está incrementada o disminuida tras la adición de T3. Con todos ellos se está procediendo a su secuenciación y caracterización.

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

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

En el promotor de MBP existe un elemento de respuesta a la hormona tiroidea (T3RE), responsable de la activación de este gen por T3 en experimentos de transfección transitoria. Nosotros hemos demostrado que el ácido 9-cis-retinoico es capaz de activar el promotor de MBP. Dicha activación es dosis-dependiente y requiere que el dominio de unión a ADN y el dominio de transactivación, AF-2, de su receptor (RXR) estén intactos. La secuencia de reconocimiento de RXR en el promotor de MBP está localizada entre +162/-40 y dicha activación no se afecta si el T3RE está mutado o delecionado.

Caracterización de la región promotora del receptor de neurotrofinas, TrkB

(D. Baretino, P. Martínez y A. Rodríguez-Peña)

Se ha caracterizado y secuenciado un fragmento de 7Kb en posición 5' de la región codificante del gen de trkB. Hemos demostrado la presencia de dos promotores. Los inicios de transcripción de cada promotor se han localizado en las posiciones -1804 para el promotor P1, y -448 para el promotor P2, con respecto al codon ATG. Estas zonas promotoras se encuentran en zonas ricas en CG. Existen varias posibles secuencias reguladoras entre las que se estudiarán dos sitios consenso CRE y varios sitios de reconocimiento para proteínas POU. La utilización de un promotor u otro puede tener relevancia en distintas situaciones fisiológicas, pero hemos demostrado que no están implicados en el procesamiento alternativo que da lugar a las formas truncadas y con actividad tirosina quinasa del receptor trkB.

Regulación del receptor de neurotrofinas, trkB, por hormona tiroidea durante el desarrollo

(P. Martínez, D. Baretino y A. Rodríguez-Peña)

El hipotiroidismo neonatal produce un dramático aumento de los niveles de transcritos para trkB en varias regiones cerebrales, y especialmente en la corteza cerebral. Este efecto se debe a un aumento de la tasa de transcripción de dicho gen. En experimentos de transfecciones transitorias con diferentes deleciones de las regiones promotoras de trkB hemos demostrado que el efecto del receptor de hormona y T3 es dual, es decir la tanto la isoforma α como la β del receptor de T3 (T3R) aumentan la actividad de la región promotora de trkB, mientras que la adición de T3 produce una importante represión de dicha actividad. Ambas acciones requieren diferentes regiones reguladoras. Así la estimulación por T3R se encuentra localizada en el fragmento -5133/-2701. Por otro lado, análisis de las deleciones de las regiones promotoras de trkB han demostrado que la represión dependiente de T3 está mediada por la interacción de T3R con una serie de medio sitios T3RE localizados 3' del inicio de transcripción del promotor P2.

Publicaciones

Ibarrola, N., Meyer-Pröschel, M., Rodríguez-Peña, A., Noble, M (1996). Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro. *Develop. Biol.* 180, 1-21.

Frade, J.-M., Martí, E., Bovolenta, P., Rodríguez-Peña, A., Rorher, H., Edgar, D., Rodríguez-Tébar, A. (1996). Insulin-like growth factor-I governs neuron differentiation in the developing chicken retina both in vitro and in vivo by inducing expression of $\alpha 6$, a subunit of a laminin integrin receptor. *Development* 122, 2497-2506.

Bovolenta, P., Frade, J.-M., Martí, E., Rodríguez-Peña, A., Barde, Y.-A., Rodríguez-Tébar, A.

(1996). Neurotrophin-3 antibodies disrupt the normal development of the chick retina. *J. Neurosci.* 16 4402-4410.

Ibarrola, N., Rodríguez-Peña, A. (1997). Hypothyroidism coordinately and transiently affects myelin protein gene expression in most brain regions during postnatal rat development. *Mol. Brain Res.* 752, 285-293.

Rodríguez-Peña, A., Ibarrola, N., Vega, S. (1997). Role of thyroid hormone on the oligodendrocyte type 2-astrocyte lineage. En "Understanding Glial Cells". Edited by B. Castellano, B. Gonzalez de Mingo y M. Nieto-Sampedro. Kluwer Academic Publishers. pp 75-88.

Tesis Doctorales

Nieves Ibarrola de Andrés.

"Regulación de la mielinización por la hormona tiroidea". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Directora: Angeles Rodríguez-Peña. Calificación: Apto "cum laude". 1996.

Pilar Martinez Garcia Pombo.

"Caracterización de las secuencias reguladoras del receptor de neurotrofinas trkB: Efecto de la hormona tiroidea sobre la expresión de dicho gen". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Directora: Angeles Rodríguez-Peña. Calificación: Apto "cum laude". 1997.

Palabras clave

Receptores nucleares, hormonas tiroideas, ácido retinoico, neuroblastomas, neurotrofinas, trkB, receptores de neurotrofinas, diferenciación, proliferación, oligodendrocitos, mielina

Señales intracelulares y proto-oncogenes implicados en el desarrollo del oído interno.

Investigador principal:	Varela, Isabel, Colaborador Científico
Investigadora Contratada:	León, Yolanda
Investigadores Invitados:	García-Gil, Mercedes (Enero-Agosto 1996) Caro, Hugo, University College London, 1996
Becarios Predoctorales:	Sanz, Carmen Frago, Laura Camarero, Guadalupe Cañón, Susana Pérez, David Rodríguez, Nelson (Febrero 1996-Febrero 1997)
Estudiantes de Licenciatura:	Peñalva, Verónica (Junio-Septiembre 1997) Pañeda, Covadonga (Septiembre 1997)
Becaria Finnova:	Fernández, Estefanía (hasta Septiembre 1997)

Señales intracelulares y proto-oncogenes implicados en el desarrollo del oído interno

(Yolanda León, Carmen Sanz, Guadalupe Camarero y Susana Cañón)

Generación y caracterización de compuestos tipo inositol fosfoglicano con actividad insulino mimética

(David Pérez)

Función y regulación por citocinas de las isoenzimas de la metionina adenosiltransferasa durante la regeneración hepática

(Laura M. Frago, Estefanía Fernández y Covadonga Pañeda)

Publicaciones

Varela-Nieto, I.(1996). Cell signalling by inositol phosphoglycans from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 223-241.

León Y., Sanz M.C., Varela-Nieto I. (1996). Modulación de la proliferación celular por factores de crecimiento y señales intracelulares durante el desarrollo del oído interno. En *Bases moleculares del cancer y sus aplicaciones clínicas*. Ed. Blasco, E., Lacal, J.C., Perona, R. Fundación Gipuzkoa, San Sebastian. pp. 115-123.

Sanz, C., León,Y., García-Gil, M. and Varela Nieto, I. (1996). Role of Raf kinases during inner ear development. *Int. J. Dev. Biol.* 83-84S. .

León, Y., Varela-Nieto, I and Breen, K.C. (1997). Neural cell adhesion molecule expression in the developing chick otic vesicle. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 10S.

Sánchez-Bueno, A., Greenwood, M.R.,Varela-Nieto, I., Marrero I., Mato, J.M. and Cobbold, P.H. (1997). Inositol phosphoglycan inhibits the hepatocyte calcium oscillator by blocking calcium entry. *Cell Calcium* 21, 125-133.

Caro, H.N., Kunjara, S., Rademacher, T.W., Leon Y., Jones, D.R., Avila, M.A. and Varela-

- Nieto, I. (1997). Isolation and partial characterization of insulin-mimetic inositol phosphoglycans from human liver. *Biochem. Mol. Medicine*. 61, 214-228.
- Gómez-Muñoz, A., Frago, LM., Alvarez, L. and Varela-Nieto, I. (1997). Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide-1-phosphate. *Biochem. J.* 325, 435-440.
- Jones, D. and Varela-Nieto, I. (1997). Role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Jones, D.R., Avila, M.A., Sanz, C. and Varela-Nieto, I. (1997). Glycosyl-phosphatidylinositol-phospholipase type D: a possible candidate for the generation of second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 432-437.

Palabras clave

Apoptosis, ceramidas, cultivos organotípicos, desarrollo embrionario, IGF-I, insulina, mediadores lipídicos, NGF, oído interno, proto-oncogenes, p75NFR, vectores retrovirales (RCAS). Análogos sintéticos, crecimiento, inositol fosfoglicanos, neurogénesis, metionina adenosiltransferasas, interleucina-6, regeneración hepática, PCNA.

Seminarios Celebrados

Maite Iglesias. National Cancer Institute Bethesda, EEUU	Efecto diferenciador de citoquinas pro-inflamatorias en los distintos estadios del cáncer cervical.
Marisa Toribio. CBM-Madrid	Determinación de linaje en los precursores intratímicos.
Joaquín Teixidó. CIB-Madrid	Identificación de regiones funcionales en la subunidad 4 de la integrina VLA-4.
Miguel Angel Peñalva. CIB-Madrid	Regulación transcripcional por pH ambiental en <i>Aspergillus nidulans</i> .
Luis A. Pérez Jurado. Dept. Genética y Pediatría Univ. de Stanford, EEUU e IIB	Hacia la definición molecular del Síndrome de Williams.
Basil Künnecke. Biozentrum der Universität Bäsel, Suiza	A quantum leap in biological sciences: magnetic resonance spectroscopy and imaging on animals and man at high field.
Ana Clara Carreras. CNB-Madrid	Organización de la proteína tirosina quinasa Ick en distintas unidades funcionales.
Bartolomé Sabater. Dept. Fisiol. Vegetal, Fac. Ciencias, Univ. Alcalá de Henares	Fotooxidación, senescencia y muerte de las hojas: ¿Un último servicio de los genes de cloroplastos?
Enrique Martín Blanco. Dept. Zoology Cambridge Univ. UK	El papel de MAPKs en el control de la diferenciación en <i>Drosophila</i> .
M. Fernández Moreno. CNB-Madrid	Biotecnología de antibióticos.
Ana Camacho. Dept. Microbiología, Fac. Medicina UAM-Madrid	Proteasa-substrato de herpes virus: PRV.
J. Fernández Santaren. CBM-Madrid	Banco de datos de proteínas de <i>Drosophila</i> .
John Farber. Thomas Jefferson Univ. Philadelphia, EEUU	The biochemistry of cell death.
Patricia Whaley. Laboratorios Clontech	A new method for cDNA subtraction of differentially expressed genes.

<p>A.G. Zapata. Dept. Biología Celular, Fac. C. Biológicas, UCM - Madrid</p>	<p>Prolactina y sistema inmune.</p>
<p>Jean E. Vance & Dennis Vance. Dept. Biochemistry, Fac. Medicine Univ. Alberta, Edmonton - Canadá</p>	<p>1) Intracellular transport and metabolism of phosphatidylserine. 2) Phosphatidylethanolamine methyltransferase 2, a candidate tumor suppressor.</p>
<p>J. Jiménez Univ. Málaga</p>	<p>Coordinación entre la maquinaria de traducción y el control de la división celular.</p>
<p>M. Vega. Inst. Parasitología y Biomedicina-CSIC Granada</p>	<p>Papel funcional de los receptores "scavenger" CD36 y CLA-I en el metabolismo de lipoproteínas.</p>
<p>Fausto García-Hegardt. U. Bioquímica, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona</p>	<p>HMG-CoA sintasa mitocondrial: crónica de un gen apasionante.</p>
<p>José Anotnio López de Castro. CBM-Madrid</p>	<p>Presentación de péptidos y reconocimiento por linfocitos T del antígeno HLA-B27 e implicaciones para su asociación a enfermedad.</p>
<p>Margarita Behrens. Neurology Dept., Washington University School of Medicine, St. Louis, EEUU e IIB</p>	<p>Modulación de la apoptosis neuronal por PKC.</p>
<p>Atanasio Pandiella. Inst. Microbiología Bioquímica-CSIC, Salamanca</p>	<p>Procesamiento regulado de factores de crecimiento y sus receptores.</p>
<p>Fátima Bosch. Dept. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Veterinaria, UAB, Barcelona</p>	<p>Modelos animales para el estudio de la diabetes.</p>
<p>C. Enrich. Fac. Medicina, Univ. Barcelona</p>	<p>Papel de la Calmodulina y de las Calmodulin-Binding Proteins en la regulación del tráfico intracelular de proteínas.</p>
<p>Robert Gillies. U. Tucson, Arizona, EEUU, y Max Planck Inst. Munich</p>	<p>Molecular mechanisms of regulation of intracellular pH in tumors.</p>

M ^a José Toro. Dept. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Medicina, U. Alcalá de Henares	Disponibilidad de colesterol y mevalonato sobre la funcionalidad de proteínas G.
Alfredo Villasante. CBM-Madrid	¿Qué conocemos sobre los centrómeros de eucariotas superiores?
Herbert Jäckle. Max-Planck Institute, Göttingen, Alemania	From gradient to stripes: pattern formation in <i>Drosophila melanogaster</i> .
Carlos López. Facultad de Biología, Univ. Valencia	Neurogénesis postnatal y regeneración en corteza cerebral de reptiles.
Gustavo Benaim. Inst. Biol. Experimental, Univ. Central Venezuela, Caracas	Regulación iónica en trypanosomatidios.
Pilar Carbonero. E.T.S.I.A., UCM-Madrid	Factores transcripcionales y control de la expresión génica en endospermo de cebada.
Carlos Avendaño. Dep. Anatomía y Morfología, Fac. Medicina, UAM	Plasticidad de sistemas neurales. Respuesta del sistema somatosensorial a la desaferentización.
Juan Velasco Georgetown University, EEUU e IIB	Detección, aislamiento y caracterización molecular del oncogen cph.
Jesús García-Foncillas. Lab. Oncología Molecular, Clinica Univ. de Navarra, Pamplona	Estudio de las alteraciones genéticas del gen BRCA1 de susceptibilidad al cáncer de mama en la población española: resultados preliminares.
Leonard D. Kohn. Depart.of Cell Regulation, NIDDK, Nat.Inst.of Health Bethesda, EEUU	Transcriptional co-regulation of thyrotropin (TSH) receptor and major histocompatibility (MHC) genes: implications for growth, function and autoimmunity.
Douglas Forrest. Mount Sinai School of Medicine, New York, EEUU	Molecular genetics studies of thyroid hormone receptors.
Rose Marie Tate. St. Georges Hospital Medical School, University of London, UK	The advantages of pattern recognition techniques for analysing in vivo MRS data of human tumors.

M ^a Angeles Chavez. Facultad de Biología, Univ. De la Habana, Cuba	Inhibidores de proteasas aislados de organismos marinos: potencialidades en Biotecnología y Medicina.
Marina Sánchez. Bristol-Myers Squibb Pharmac. R.I. Princeton y CBM-Madrid	Comunicación intercelular durante el desarrollo. Funciones del GDNF.
Juan Miguel Redondo. CBM-Hosp. De la Princesa, Madrid	Antioxidantes y activación linfocitaria.
María Gasset. Inst. Química-Física Rocasolano-CSIC, Madrid	Los priones: una conformación proteica auto-propagativa.
Francisco Real. Inst. Municipal de Investigación Médica, Barcelona	Diferenciación celular en el epitelio pancreático: fenotipos y mecanismos.
Alvaro Martínez del Pozo. Fac. Ciencias Químicas, Univ. Complutense Madrid	¿Qué necesita una ribonucleasa para volverse citotóxica?.
Bonifacio Díaz Chico. Dept.endocrinología Celular y Molecular, Univ. De las Palmas	Formas nativas de receptor estrogénico en cáncer de mama.
Javier Vinós. Universidad de California, San Diego, EEUU	RDGC (retinal degeneration C), caracterización de una fosfatasa específica de receptores acoplados a proteínas G.
Miguel Angel Asunción. Hospital Ramón y Cajal, Madrid	Colesterol y proliferación celular.
Mónica Fanarraga. Dpto.Bioquímica y Biología Molecular, Fac.Medicina, Universidad de Cantabria,Santander	Orígenes, diferenciación y maduración del linaje Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A)
Juan Viña. Dept. Bioquímica i Biología Molecular, Fac.de Medicina i Odontología, Universidad de Valencia	La oxoprolina regula el transporte de aminoácidos en células de mamífero.
Elena Urcelay. CIB-Madrid	Virus asociado a adeno (AAV): vector potencial de terapia génica.

Manuel López Cabrera. Unidad Biología Molecular, Hosp. La Princesa-Madrid	Regulación de la activación linfocitaria en procesos inflamatorios.
M. Farias. Universidad Nac. Tucumán, Argentina	Modo de acción de hormonas tiroideas en membranas modelo.
Pura Muñoz. Institut de la Recerca Oncologica, Barcelona	Regulación diferencial del gen uPA en distintos compartimentos miogénicos.
José Brieva. Servicio Inmunología, Hosp.Univ.Puerta del Mar, Cádiz	Regulación por apoptosis de linfocitos B periféricos humanos.
José Manuel Andreu. CIB-Madrid	Secuencias de superficie de tubulina, estructura secundaria y homología con la proteína de división celular bacteriana FtsZ.
José Pichel. Nat. Inst. of the Health, Bethesda, EEUU y , CIB-Madrid	Análisis de los ratones mutantes para el GDNF (Factor neurotrófico derivado de línea celular glial). Defectos en la inervación entérica e inducción renal.
Pere Berbel. Inst. de Neurociencias. Fac. Medicina, Universidad de Alicante	Papel de las hormonas tiroideas en la organización de la neocorteza.
Fernando J. Corrales. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK	Plagamiento de la barnasa en presencia de GroEL. Análisis del mecanismo de acción de la chaperona.
Esteban C. Dell'Angelica. Nat. Inst. of the Health, Bethesda, EEUU	Maquinaria del transporte de proteínas a la membrana: identificación de dos nuevas proteínas humanas.
Lluís Montoliu. CNB-Madrid	Una Locus Control Region en el gen de la tirosinasa: utilización de los cromosomas artificiales en ratones transgénicos.
José León. CNB-Madrid	Defensa frente a patógenos y heridas en plantas.
Bao-en-Wang. Prof.of Medicine and dean of 2 nd Faculty, Beijing Friendship Hospital, China	Tratamiento de la fibrosis hepática mediante medicina tradicional china.

Ricardo Escalante. Center for molecular Genetics, University of California, San Diego, EEUU	Identificación de genes de desarrollo en <u>Dictyostelium</u> por la técnica REMI (<u>R</u> estriction <u>E</u> nzyme <u>M</u> ediated <u>I</u> ntegration): <u>MigA</u> , una proteína con dominio BTB, está implicada en motilidad celular y migración.
Elias Campo. Hospital Clínico, Barcelona	Alteraciones moleculares en genes reguladores del ciclo celular en tumores humanos.
Alfredo Rodríguez-Tebar. Inst. Cajal-Madrid	Una nueva fuerza inductiva en el desarrollo del tubo neural cefálico.
Manuel Sánchez del Pino. Cambridge Center for Protein Engineering	Nonsequential unfolding of the a/b protein indole-3-glycerol-phosphate synthase.
Luis Rivas. CIB-Madrid	Péptidos antibióticos. Su aplicación en la terapia de las Leishmaniasis.
Maite Iglesias. National Cancer Institute, Bethesda, USA	La inmortalización de queratinocitos cervicales alteran la secreción y respuesta de citocinas implicadas en el proceso inflamatorio.
Miguel Angel Peñalva. CIB-Madrid	Bases moleculares de la alcaptonuria.
Darryl Macer. Inst. of Biological Sciences. University of Tsukuba, Japón	Universal bioethics, cloning and genetics.
Ana Martínez. The Netherlands Cancer Inst. Amsterdam	Función de las integrinas $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta4$ en los procesos de adhesión a la matriz extracelular y su localización en contactos focales y hemidesmosomas.
Carlos López Otín. Dept. Biología Funcional, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo	Estructura y función de nuevas proteasas asociadas a procesos tumorales.
Sonia Martínez Arca. CBM-Madrid	Mecanismos moleculares involucrados en el transporte de GLUT4.
Anibal Vercesi. Universidad de Campina, Brazil	Membrane permeability transition in liver mitochondria induced by Ca^{2+} and free radicals.
Gustavo Benaim. Inst. Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Univ. Central de Venezuela, Caracas	Efecto del etanol y del fosfatidil-etanol sobre la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos.

<p>José Vicente Sinisterra. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid</p>	<p>Influencia de la actividad del agua (aw) en las biotransformaciones en medios orgánicos débilmente hidratados.</p>
<p>Ursula Sonnewald. Pharmacology and toxicology, Medical School, Trondheim, Noruega</p>	<p>Metabolic interactions studied by NMR spectroscopy. From cell culture to human brain.</p>
<p>Claudio J. Conti. Anderson Cancer Center Smithville, Texas, EEUU</p>	<p>La expresión de distintas queratinas define subpoblaciones en el componente epitelial del timo.</p>
<p>Julio Pérez Márquez. Universidad de Columbia, Nueva York, EEUU</p>	<p>Los androgenos como factores tróficos y de crecimiento.</p>
<p>Teresa Villalba. Dpto. de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, Madrid</p>	<p>Hacia una vacuna para la alergia al polen del olivo.</p>
<p>Angela Nieto. Instituto Cajal, Madrid</p>	<p>Biología molecular de la guía axonal: receptores Eph y sus ligandos</p>
<p>Paola Boloventa. Instituto Cajal, Madrid</p>	<p>Six3 y Otx2, dos factores de transcripción implicados en el desarrollo del ojo de vertebrados.</p>
<p>Fernando Larcher. Dept. Biología Molecular y Celular, CIEMAT, Madrid</p>	<p>Papel del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) en la angiogénesis cutánea normal y tumoral.</p>
<p>Ignacio Santiago. Dept. Biología Molecular, Universidad Extremadura, Badajoz</p>	<p>Centros organizadores durante el desarrollo embrionario. Papel de los factores de crecimiento.</p>
<p>Sergio Moreno. Instituto Microbiología Bioquímica-CSIC/Universidad de Salamanca</p>	<p>Regulación del inicio del ciclo celular por fosforilación y degradación de inhibidores de Cdk.</p>
<p>Ruggero Montesano. Int. Agency for Research on Cancer Lyon, France</p>	<p>Molecular Epidemiology of Esophageal Cancer.</p>
<p>Brian C. Monk. Molecular Microbiology Laboratory, Dep.of Oral Sciences and Orthodontics, Univ. Of Otago, Dunedin, New Zealand</p>	<p>Yeast plasma membrane H⁺ATPase: A target for antifungal design.</p>

Angel Durán.
Instituto Microbiología Bioquímica-
CSIC/Universidad de Salamanca

Biogénesis de la pared celular fúngica:
Biosíntesis de quitina en *Sacharomyces*
cerevisiae.

Ignacio Palmero.
CNB-Madrid

Regulación del supresor de tumores p16(ink4)
y senescencia celular.

Cursos Impartidos

a) Programa de Doctorado del Departamento de Bioquímica

Curso 96-97

Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. I	R.Garesse J. Renart
Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. II.	M. Quintanilla A. Sillero
Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. III.	M. Fernández L. Sastre
Bases Moleculares de la Patología	J. G. Castaño J. E. Felú J. M. Mato
Biología Molecular de Receptores Neuronales	J. G. Castaño J. Renart
Bioquímica, Fisiología y Fisiopatología endocrina: hormonas tiroideas yodadas	G. Morreale
Cáncer: Oncogenes y Genes Supresores	A. Muñoz
Genética Molecular de las Enfermedades de Herencia mitocondrial	R. Garesse
RMN en Medicina y Biología	S. Cerdán
Seminarios de Bioquímica, Biología Molecular y Celular	R. Garesse A. Muñoz J. Renart

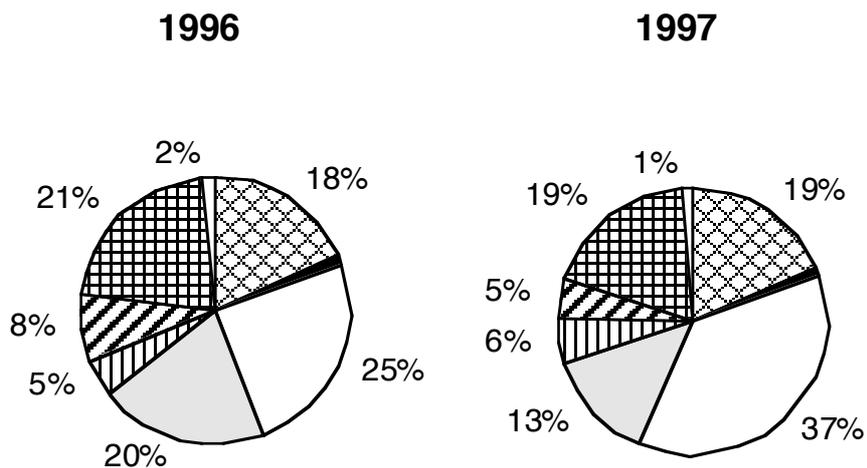
Curso 97-98

Aplicación del HPLC a la Biomedicina	P. Llorente
Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. I	J. J. Aragón A. Coloma
Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. II.	C. Fernández Heredia R. Marco
Bases Bioquímicas y Moleculares de la Función Celular. III.	A. Cano J. E. Felú

Biología Molecular de Receptores Neuronales	J. G. Castaño J. Renart
Bioquímica, Fisiología y Fisiopatología endocrina: hormonas tiroideas yodadas	G. Morreale
Curso de Operadores de Instalaciones Radioactivas	M ^a Teresa Macías L. Sastre
Genética Humana Molecular	J. G. Castaño A. Coloma
RMN en Medicina y Biología	S. Cerdán
Seminarios de Bioquímica, Biología Molecular y Celular	R. Garesse P. Santisteban
Simposium de Oncogenes VII	J.C. Lacal R. Perona
b) Otros cursos	
Genotoxic Agents and Cancer (Fundación Ramón Areces, 1997)	Rosario Perona Michael Karin (UCSD)

Resumen de Datos Económicos

DISTRIBUCION DE LOS PROYECTOS SEGUN LA ENTIDAD FINANCIADORA



-  P.N. de Salud y Farmacia
-  P.N. del Espacio
-  Promoción General del Conocimiento
-  Fondo de Investigaciones Sanitarias
-  Comunidad de Madrid
-  Contratos
-  Unión Europea
-  Fundación R. Areces

Indice de Personas citadas

a) Jefes de laboratorio

Alemanya, Susana 95
Aragón, Juan José 81
Aranda, Ana 113
Bernal, Juan 55, 83
Cano, Amparo 15, 31
Castaño, José G. 97
Cerdán, Sebastián 99
Cervera, Margarita 117, 125
Coloma, Antonio 55, 83, 119, 141
Cruces, Jesús 83, 119
Cuadrado, Antonio 139
Eraso, Pilar 41, 47, 49
Felú, Juan Emilio 141
Fernández de Heredia, Claudio 87
Fernández, Margarita 103, 145
Gancedo, Carlos 43
García Vallejo, Carmen 121
Garesse, Rafael 123, 125
Günther, M^a Antonia 91
Lacal, Juan Carlos 19, 25
Lagunas, Rosario 45
Llorente, Pilar 89
Marco, Roberto 117, 123, 125
Martín Pérez, Jorge 143
Mato, José María 105
Mazón, M^a Jesús 41, 47, 49
Morreale de Escobar, Gabriela 59, 71
Muñoz, Alberto 55, 67
Obregón, M^a Jesús 55, 59, 71
Pajares, María de los Angeles 105
Pascual, Angel 129
Pérez-Castillo, Ana 131
Perona, Rosario 19, 25
Pestaña, Angel 27
Portillo, Francisco 41, 47, 49
Quintanilla, Miguel 15, 31
Renart, Jaime 145
Rodríguez-Peña, Angeles 121, 147
Sagarra, Rosa 97
Santisteban Pilar 75
Sastre, Leandro 135
Sempere, Juana María 51
Sillero, Antonio 91
Vara, Francisco 109
Varela, Isabel 151
Villalobo, Antonio 35

b) Personal

Abad de Diego, Ana 89
Abajo, Ricardo de 55
Aguilera, Abelardo 109
Alguacil, Rafael 9, 11
Alonso, Javier 27
Alvarez, Alberto 131
Alvarez, José 99
Alvarez, Luis 105
Alvarez, Manuel 67
Alvarez, M^a del Mar 131
Arán, Vicente 89
Arenas, Joaquin 123
Arends, Mark 19
Ares, Susana 59
Argomaniz, Luisa 89
Arredondo, Juan J. 117
Arregui, M^a Rosa 12
Asunción, Miryam 59
Atencia, Eva Ana 91
Avila, Matías 105
Ballester, Alicia 95
Ballesteros, Paloma 99
Balmain, Allan 15
Barettino, Domingo 147
Barón, Gabriel 12
Barroso, Isabel 75
Behrens, Jurgen 15
Behrens, M. Margarita 145
Belandia, Borja 129
Bélanger, Diego 35
Bello, M^a José 27
Benaim, Gustavo 35
Benlloch, Teresa 141
Benoist, Patrick 117
Berlanga, Oscar 31
Bermúdez de Castro, M^a Isabel 43
Birchmeier, Walter 15
Biryukov, Alexander 91
Bonilla, Felix 25
Bornstein, Belén 123

Botazzi, Cristina 55
 Bravo, M^a del Carmen 55
 Bravo, Rodrigo 19
 Bullard, Belinda 117
 Caballero, Amelia 83
 Cabrero, Sofía 125
 Caelles, Carme 67
 Calés, Carmela 103
 Calvo, Rosa Maria 71
 Calvo, Victor 95
 Camarero, Guadalupe 151
 Campos, José M^a. de 27
 Cañavete, Mercedes 25
 Candel, Elena 83
 Cañón, Estela 113
 Cañón, Susana 151
 Cantón, Emilia 125
 Carcamo, Cristina 109
 Carceller, Fernando 99
 Caro, Hugo 151
 Carretero, M^a Victoria 143
 Carrillo, Juan José 141
 Casas, Pilar 83
 Casero, Marie-Carmen 135
 Castillo, Ana Isabel 113
 Cejas, Paloma 145
 Chacón, Gloria 55
 Clarys, Renée 12
 Corrales, Fernando 105
 Couso, Aldina 35
 Cruz, Fátima 99
 Cuadrado, Ana 67
 Cuenca, Silvia 12
 De Diego, Fátima 131
 de Juan, Emilio 125
 de la Fuente, Natalia 49
 de la Puente, Aránzazu 83
 De la Vieja, Antonio 75
 Deigner, H. Peter 105
 del Peso, Luis 19
 Di Donato, Armando 19
 Di Lauro, Roberto 75
 Díaz, Carlos 125
 Díaz-Guerra, Margarita 145
 Diego, Ana Isabel de 91
 Dilla, Tatiana 75
 Dominguez, Aurora 143
 Dominguez, Carmen 103
 Dukhovich, Alexey 91
 Durán, Socorro 59
 Embade, Nieves 19
 Escalante, Ricardo 135
 Escámez, María José 55
 Escobar del Rey, Francisco 59, 71
 Escobar-Morreale, Hector, 59
 Escribano, Victoria 47
 Escrivá, Hector 147
 Espada, Jesús 15
 Espinosa, Antonio 19
 Espliguero, Gemma 147
 Esteban, Andrés 141
 Esteve, Pilar 19
 Fabra, Angles 15, 31
 Falcón, Juan Manuel 41
 Fernández, Antonio 12
 Fernández de Castro, Mercedes 109
 Fernández, Elena 87
 Fernández, Estefanía 75
 Fernández, Estefanía 151
 Fernández, Félix 19
 Fernández, Isabel 129
 Fernandez, Miguel A. 123
 Fernández- Mayoralas, A. 81
 Flores, Carmen-Lisset 43
 Fontes, Rui 91
 Forrest, Douglas 59
 Frago, Laura 151
 Fraile, Benito 117
 Freire de Mesquita , Joelma 51
 Fresno, Juan Angel 143
 Frontelo, Pilar 31
 Gallardo, Manuel 11
 Gallego, Juan Carlos 19
 Galy-Ache, Myriam 91
 Gamallo, A. 27
 Gamallo, Carlos 15, 31
 García, Angel 12
 García, Bibian 71
 García, Gabriela 55
 García, Hector 67
 García, Luis F. 67
 García, Paloma 103
 García-Espinosa, M^a Antonia 99
 García-Gallo, Mónica 145
 García-Gil, Mercedes 151
 García-Martín, M^a Luisa 99
 García-Miguel, Purificación. 27
 García-Nieto, Rosa María 35
 García-Pérez, Ana 99
 García-Ripoll, Isabel 141

Garrido, Aurelio 141
 Garrido, Francisco 105
 Garrido, Mariano 11
 Geronimo, Haydee 143
 Gil, Beatriz 105
 Gobernado, Miguel 125
 Gómez, Carmen 35
 Gómez, Lourdes 25
 González, José M. 67
 González, Margarita 67
 González, M^a del Carmen 141
 Grau, Rosa 89
 Guadaño-Ferraz, Ana 55
 Guerra, Javier 25
 Gutiérrez, Ana 12
 Gutiérrez, Julio César 141
 Gutkind, Silvio 19
 Heinisch, J.J. 81
 Hermida, Carmen 81
 Hernández, Arturo 71
 Hernández, Rubén 19
 Hernández, Silvia 35
 Hernandez-Moneo, Jose.L. 27
 Hernandorena, Arantxa 125
 Ibarrola, Nieves 147
 Horcajadas, José Antonio 35
 Iglesias, Maite 31
 Illescas, Damaris 31
 Jiménez, Amparo 35
 Jiménez, Benilde 67
 Jiménez, Cristina 35
 Jimenez-Lara, Ana M^a 113
 Keyse, Stephen 25
 Kusak, M^a.Elena 27
 Laforga, Javier 11
 Lafuente, María Jose 43
 Lai, Cary 131
 Langa, M^a Paz 11
 Larcher, Fernando 15, 31
 Lavado, Rosalía 59
 Leal, Almudena 141
 Lefai, Etienne 123
 León, Javier 19
 León, Yolanda 151
 Leone, Paola 27
 Lindley, Christopher 51
 Lisbona, Carlos 95
 Llanos, Susana 67
 Loaliza, Andrea I. 75
 López, Emilio 99
 López, Judith 113
 López, M. Dolores 145
 López, M^a Carmen 105
 López, Raquel 91
 Lorenzo, Petra Isabel 55
 López, Roberto 12
 Losada, Alejandro 75
 Lozano, Encarnación 15
 Lucas, Luisa 19
 Lucero, Pilar 45
 Luengo, Gema 12
 Luengo, M^a Carmen 12, 113
 Macías, M^a Teresa 12
 Madrid, Olga 91
 Maldonado, Ana M^a 49
 Mancilla, Francisco 91
 Marín, Mari Cruz 41
 Marques, A.Franklim 91
 Martín, Eva 71
 Martín, José 113
 Martín-Lomas, M. 81
 Martín-Nieto, José 35
 Martínez de Arrieta, Cruz 83
 Martínez de la Mata, Jorge 113
 Martínez de Mena, Raquel 71
 Martinez Piñeiro 25
 Martínez Ripoll, Martín 105
 Martinez, Ana 135
 Martínez, Jorge 31
 Martínez, M^a Luz 105
 Martínez, Pilar 147
 Martinez, Raúl 143
 Mas, José Antonio 125
 Mato, Eugenia 75
 Mawell, Ross 99
 Mayo, Isabel 97
 Medina, Begoña 12
 Medina, Diego L. 75
 Medina, Gema 71
 Medina, Javier 125
 Mendiola, Marta 27
 Menéndez, Javier 43
 Menéndez-Hurtado, Ana 131
 Merino, Javier 12
 Miki, Toru 19
 Mingorance, Jesús 105
 Mingot, Manuela 11
 Molano, Jesús 41, 47, 49
 Molina, Susana 109
 Montaner, Silvia 19

Montero, Celia 89
 Montes, Amalia 15
 Monteserín, Rosa 11
 Montiel, Carmen 145
 Moratilla, Carmen 145
 Moreno, Eulalia 45
 Moreno, Gema 103
 Moreno, José Carlos 75
 Moreno, M^a Carmen 11
 Morgado, Eulalia 47
 Morte, Beatriz 55
 Müller, Verena 113
 Muñoz, M^a Josefa 141
 Murguía, José Ramón 25
 Navares, Ramón 12
 Navarrete, Mercedes 75
 Navarro, Cristina 67
 Navarro, M^a Asunción 87
 Nebreda, Paloma 27
 Nieto, Angela 15
 Nuñez, Fernando 12
 Obies, Clara 43
 Ochoa, Pilar 123
 Oliva, Joaquín 97
 Orosz, F. 81
 Ortiz, Lourdes 75
 Ortiz-Caro, Javier 135
 Ovádi, J. 81
 Palacios, José 15
 Palomino, Teresa 113
 Palomo-Jiménez, Paloma I. 35
 Pañeda, Covadonga 151
 Pantoja, Cristina 143
 Pascual, José M^a 99
 Pastor, Rosa M^a 147
 Pedraza, Pablo Enrique 59
 Peñalva, Verónica 151
 Peñalver, Élica 45
 Pérez, David 151
 Pérez, Javier 12
 Pérez Jurado, Luis 83
 Pérez-Juste, Germán 113
 Petit, Thomas 43
 Pignatelli, Miguel 131
 Pina, Raquel 12
 Posada de la Paz, Manuel 141
 Presas, M^a Jesús 59
 Queizán, Antonio 27
 Quero, José 59
 Ramón y Cajal, Santiago 15, 31
 Ramos, M^a Angeles 19
 Recio, Juan Angel 113
 Rey, Juan A. 27
 Rivera, Pilar 89
 Roda, José M^a 99
 Rodrigo, Isabel 15
 Rodríguez Arrondo, José Luis 105
 Rodríguez, Cristina 43, 51
 Rodríguez, Jesús 11
 Rodríguez, Manuela 12
 Rodríguez, Nelson 151
 Rodríguez, Pilar 19
 Rodríguez-Tarduchy, Gemma 12
 Rodríguez-Vilariño 97
 Ros, Purificación 75
 Rosa, Juana de la 12
 Ruiz Marcos, Antonio 59
 Ruiz, Felix 35
 Ruiz, Inmaculada 123
 Ruiz, Yolanda 129
 Ruiz-Peinado, Adela 12
 Ruiz-Peinado, José Vicente 11
 Saez-Castresana, Javier 27
 Sánchez, Cristina 35, 81
 Sánchez, Estrella 105
 Sánchez, Isabel 25
 Sánchez, Jerónimo 99
 Sánchez, Valentina 81
 Sánchez-Góngora, Estrella 95
 Sánchez-Pacheco, Aurora 113
 Saniger, Luisa 25
 Santamaría, M^a Belén 81
 Santibáñez, Juan F. 31
 Santos, Angel 131
 Sanz, Carmen 151
 Sarasa, Jose L. 27
 Scholl, Francisco G. 31
 Schröder-van der Elst, Janny 71
 Seguido de la Fuente, Ana M^a 121

Señor, Pablo 12
Seisdedos, M^a Teresa 75
Selgas, Rafael 109
Santana, Mónica 15
Serrano, Juan Ramón 91
Sesto, Angela 83
Siedemberg, Markus 35
Sanz, Carmen 151
Sarasa, Jose L. 27
Señor, Pablo 12
Silles, Eduardo 47
StGermain, Donald 55
Stürtz, Laszlo 99
Suárez, Concepción 19
Suju, Meylin 35
Talamillo, Ana 123
Tapia, Lucia 125
Tobar, Juan 75
Tobeña, Rafael 95
Tolón, Rosa 113
Too, H. Phon 105
Tovar, Juan 59
Ugalde, Cristina 123
Uña, Ricardo 12
Vaquero, Jesús 27
Vara, Rafael 12
Vargiu, Pierfrancesco 55
Vega, Sonia 147
Vega-Nuñez, Elena 131
Velasco, Ana 95
Velasco, Juan Angel 75
Vercesi, Anibal E. 35
Vilaró, Senén 31
Villa, Aida 125
Villa, Ana 129
Wieprecht, Marcus 19
Yañez, Esther 51
Yolanda Ruiz León 105
Zaera, Eulalio 91
Zaragoza, Oscar 51
Zorzano, Antonio 131

Indice de Palabras Clave

5'D 74
 5D 74
 ácido retinoico 149
 acil CoA sintetasa 92
 actina 136
 activación linfocitos T 96
 activación por glucosa 50
 adenilación de proteínas 38
 adhesión celular 18
 adipocitos marrones 74
 agentes de contraste 101
 AKT 139
 análisis fenotípico 48
 análisis mutacional, 29
 análogos sintéticos 152
 anomalías cromosómicas 28
 antitumorales 23
 apoptosis 23, 26, 139, 146, 152
 Artemia 88, 122, 127, 136
 astrocitomas 28
 astrocitos 58
 ATP sintetasa 124
 ATPasa 136
 autoinmunidad 98
 Bcl2 146
 betaína 107
 betaína homocisteína metiltransferasa 107
 C/EBP 133
 cadherina E 34
 cadherinas 18
 calcio 38
 calmodulina 38, 58
 cAMP 52
 cáncer de mama 143
 cáncer de próstata 26
 CAPD 110
 carcinogénesis 34
 carcinogénesis piel 18
 carcinoma mamario 18
 caseína kinasa I 104
 cateninas 18
 células en cultivo 129
 células hipofisarias 116
 ceramidas 152
 cerebro 58, 65, 70, 133
 CFTR 42, 48
 ciclo celular 78
 cisplatino 26
 clonaje 104
 ClpP 98
 conexinas 38
 control de expresión 118
 corteza cerebral 58
 COT quinasa 96
 crecimiento 152
 cretinismo 58
 cultivos organotípicos 152
 deleciones cromosómicas 29
 deleción 48
 desarrollo 133, 136
 desarrollo cerebral 58
 desarrollo embrionario 152
 desdoyadasas 58, 74
 Dictyostelium 82, 104, 136
 dideoxinucleótidos 92
 diferenciación 104, 149
 diferenciación neuronal 70, 116
 dinucleósido polifosfatos 92
 distrofias musculares congénitas 85
 DNA mitocondrial, 122, 124
 Drosophila 118, 124, 127
 E1A 34
 efluentes peritoneales 110
 embarazo 65
 eminencia media 58
 endocitosis 46
 enfermedad de Alzheimer 129
 enfermedades hereditarias 85
 envejecimiento 127
 enzimas mitocondriales 122
 enzimopatías 142
 erbA 70
 espacio 127
 espectroscopía por resonancia magnética 101
 estrés 26
 estructura-función 42, 48
 excitotoxicidad 146
 expresión génica 58, 78, 122, 129, 143
 factor AP-1 70
 factores de crecimiento 23, 110, 116, 129
 factores de transcripción 18, 52, 122
 feto 65
 fosfocalmodulina 38
 fosfodiesterasas 38
 fosfofructokinasa 82
 fosfolípidos 23
 fosforilación 98
 fosforilación en tirosina 143
 fructosa-1,6-bisfosfatasa 52

Fusarium. 88
 geldanamicina 146
 genes supresores 29
 genética humana 85
 glía 70
 glicolisis 44, 52, 82, 88
 gliomas 28
 glucocorticoides 70
 gluconeogénesis 82
 glucosamina 88
 glutamina 82
 glutation 107
 GTPasas 23
 H⁺-ATPasa 42, 50
 H-ras, 18
 hepatocitos 142
 hexokinasa 44
 HGF 34
 hibridoma 82
 hígado 133
 hipocampo 58
 hipotiroidismo 58
 hormonas 129
 hormonas tiroideas 58, 70, 133, 149
 IGF-I 152
 imagen por resonancia magnética 101
 IMP/GMP 5'-nucleotidasa, 92
 inactivación catabólica 46
 inositol fosfoglicanos 152
 insulina 152
 interleucina-6 152
 interleuquina-2 96
 Interrupción génica 48
 invasión 18, 34
 isquemia cerebral 101
 Jak 143
 L-5178Y 90
 lactasa intestinal 82
 lectinas 38
 leucemia 90
 levadura 44, 52, 88
 localización subcelular 48
 luciferasa 92
 luz UV 26
 macrófagos y peritonitis 110
 MAP quinasa quinasa quinasa 96
 MAPK 146
 mediadores lipídicos 152
 membrana plasmática 50
 memoria 58
 meningiomas 28
 MERRF 124
 metabolismo de neuronas y astrocitos 101
 metaloproteasas 18
 metástasis 18, 23, 34
 metionina 107
 metionina adenosiltransferasa 107
 metionina adenosiltransferasas 152
 microgravedad 127
 microondas 127
 microtúbulos 82
 mielina 149
 mitocondria 122, 124, 127, 133
 MTX 90
 músculo 118, 127
 mutagénesis dirigida 42, 48
 neonato 65
 neoplasmas neurogénicos 28
 neuregulinas 133
 neuroblastoma 146
 neuroblastomas 28, 149
 neurogénesis 152
 neurogranina 58, 85
 neuronas 58
 neurotrofinas 116, 149
 NGF 139, 152
 núcleo estriado 58
 nucleótido fosfohidrolasa 88
 nucleótido pirofosfatasa 38
 obesidad 142
 oído interno 152
 oligodendrocitos 149
 oncogenes 26
 óxido nítrico 38, 107
 p75NFR 152
 PA2.26 34
 patología mitocondrial 124
 PCNA 152
 PDGF 70
 pH 101
 piruvato carboxilasa 44
 poblaciones celulares del peritoneo 110
 polifosfatos 92
 poliglutamilación 90
 prematuros 65
 progresión tumoral 18
 proliferación 26, 149
 proliferación/diferenciación celular 143
 promotores 136
 promotores mitocondriales 124

prostaglandina D2 sintasa 70
 proteasoma 98
 protein kinasas 104
 proteína kinasa C 58, 146
 proteina kinasas mitocondriales 122
 proteólisis 98
 proto-oncogenes 152
 proyecto genoma humano 85
 PSA 26
 Raf-1 146
 Ras 23
 RC3 58
 recambio de proteínas 46
 receptor del factor de crecimiento epidérmico 38
 receptores de glutamato 146
 receptores de neurotrofinas 149
 receptores de prolactina 143
 receptores muscarínicos 139
 receptores nucleares 70, 116, 149
 reciclaje de piruvato 101
 regeneración hepática 152
 regulación alostérica 82
 regulación expresión génica 133
 regulación hormonal, 78
 regulación por glucosa 42
 regulación transcripcional 116
 replicación mitocondrial 124
 represión catabólica 52
 resistencia a insulina 142
 resistencia celular 90
 retinoides 70
 Rho 23
 RNA 12S 122
 RNAs mitocondriales 122
 S-adenosilmetionina 107
Saccharomyces cerevisiae 42, 46, 50, 52, 82, 88
 secuencias alfoide 85
 señalización celular 104
 Ser/Thr quinasa 139
 síndrome de Williams 85
 SNC 98
 Src 143
 SRF 136
 β -ATPasa 122
 sulfonilureas 142
 supervivencia 139
 supresión intragénica 42
 T3 58, 74
 T4 58, 74
 tanicitos 58
 tenascina 70
 TGF- β 34
 tiroides 58
 Tirosín-quinasas 38
 tiroxina 65
 TNF- α 96
 transcripción 136
 transcripción basal 78
 transcripción específica de tejido 78
 transcripción, promotores mitocondriales 122
 transducción de señales 78, 139
 transformación 23
 transmisión de señales 23
 transporte de azúcares 46
 transporte hexosas 88
 trehalosa-6-fosfato 52
 triyodotironina 65
 trkA 139
 trkB 149
 troponina C 127
 troponina T 127
 tubulina 58, 82
 tumor ascítico 82
 tumores 101
 UCP 74
 uniones intercelulares comunicantes 38
 vectores retrovirales (RCAS) 152
 YCF 42
 YCF1 48
 yodo 65

Summaries

Department of Molecular and Cellular Biology of Cancer

Role of E cadherin and P cadherin in tumor progression. Regulation of their expression and function

Group leader: Amparo Cano

Our studies on the implication of E cadherin (E-CD) and P cadherin (P-CD) 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 E-CD. The analysis of the E- and P-CD promoters have shown that the basal activity of both promoters are mediated through the 5' proximal GC-rich and CCAAT regions which are recognized by common factors in both promoters (Sp1 and CP1, respectively) and by additional factors in the E-CD promoter (AP2 and CP2, C/EBP). Furthermore, the E-CD promoter is negatively modulated by the palindromic E-pal element and an Ets-binding site, with a predominant role of the E-pal element in E-CD deficient cells. The basal activity of the P-CD promoter, on the other hand, is modulated by an AP1-binding site present in an enhancer located in the first intron of the gene. The studies on the E-CD/catenin complexes present in cell lines of different stages of tumor progression have shown the involvement of the complexes containing plakoglobin in the maintenance of stable cell-cell contacts and a partial tumor-suppressor role of the E-CD/plakoglobin complexes. The organization and functional activity of the E-CD/catenin complexes is negatively influenced by oncogenic H-ras in this system. On the other hand, our studies on the invasive and metastatic behavior of E-CD (+) and E-CD (-) keratinocyte cell lines strongly support that the anti-invasive role of E-CD in this system is mediated through the downregulation of the metalloproteinase MMP-9 .

Signal Transduction Pathways Regulated by Growth Factors and Oncogenes

Group Leader: Juan Carlos Lacal

Our group is engaged in the characterization of signal transduction pathways involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis triggered by growth factors and oncogenes. While growth factors define the physiological conditions for the regulation of these events, the involvement of activated oncogenes define their pathological state. Our major interest is dedicated to different members of the Ras superfamily of GTPases, including both the Ras and the Rho branches. Special attention is dedicated to two specific areas :

- 1) the role of the regulation of the metabolism of phospholipids
- 2) the involvement of Rho proteins in the regulation of transcriptional events

Our studies have demonstrated the relevance of the activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase D (PC-PLD) in the induction of cell proliferation by growth factors and oncogenes. We have also demonstrated the transforming potential of Rho proteins as well as their ability to trigger an apoptotic response under conditions of stress or cytokines treatment.

Biological responses induced by the DNA damaging agents: cisplatin and UV light.

Group Leader: Rosario Perona

The main objective of our group is the study of the mechanism of apoptosis induction by the DNA damaging agents UV light and cisplatin. We have found that jun kinase (JNK) is activated by both agents and the timing of activation of this enzyme is directly correlated with apoptosis induced by both mechanisms. Moreover, positive modulation of JNK activity by using tyrosine phosphatase inhibitors increases the apoptotic response to the platinum compounds. We have also found that inactive platinum compounds fail to induce persistent JNK activation because they very efficiently activate the synthesis of MKP-1 while the active compounds do not. On the other hand cisplatin activates JNK by the MEKK1-SEK1 cascade. Inhibition of these kinases by transfection of dominant negative mutantas against them, protects cells from apoptosis induced by cisplatin. We are studying the role of the activating and inactivating cascade of JNK in cell lines and tumours resistant to cisplatin. Finally we have generated a library of human genetic supressor elements and use it to isolate cell lines resistant to cisplatin. These sequences will be used to obtain bone marrow cells resistant to the drug and to study the behaviour of the cells in animals in response to intensive therapies with cisplatin.

Tumoral progression patterns in neurogenic neoplasms

Group Leader: Angel Pestaña

We are investigating the molecular mechanisms responsible for the malignant progression of neurogenic neoplasms, and evaluating the predictive value of the genomic anomalies characterizing each histological subtype of neoplasm.

Our previous data demonstrated that astrocytic and oligodendroglial tumors display different patterns of formation, and we are now analyzing the involvement of *MTS1*, *MTS2*, *PTEN/MMAC1* and *DMBT1* suppressor genes in neoplastic progression of both glioma subtypes.

In meningiomas we are mainly analyzing sporadic forms, which usually result from inactivation (deletion and mutation) of the *NF2* gene (located at 22q12). In atypical and anaplastic samples we have shown the accumulation of secondary anomalies : deletions at 1p and 14q.

We had previously found a high incidence of 1p deletions in oligodendrogliomas and neuroblastomas and, thus, we are now performing a high resolution deletion mapping analysis of this genomic region. Using microsatellite markers to analyze 30 loci spanning the short arm of chromosome 1, we intend to delimit the loci involved in those neoplasms, mainly taking into consideration that previous cytogenetic and molecular data suggest that up to four tumor suppressor genes might be located on 1p. Our study will provide evidence on the involvement of distinct 1p subregions (that is distinct tumor supressor genes) in every neurogenic neoplasm: meningioma, oligodendroglioma, neuroblastoma.

Malignant progression in mouse skin carcinogenesis

Group leader: Miguel Quintanilla

Our laboratory is studying cellular and molecular events associated with malignant progression in mouse epidermal carcinogenesis. Our main achievement have been the demonstration of a role of TGF- β 1 as a modulator of the epithelial phenotype and the invasive and metastatic abilities of squamous carcinoma cells. On the other hand, we have completed the biochemical and molecular characterization of PA2.26 antigen, a sialylated glycoprotein of the cell surface induced in tumor and stromal cells during carcinogenesis, and, apparently, involved in cell migration. We have also continued our studies about the involvement of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in invasion and metastasis, and that of adenoviral E1A gene as a tumor suppressor and its implication for gene therapy, in collaboration with other groups.

Cellular communication in normal and tumor cells

Group leader: Antonio Villalobo

The scientific interests of our group are the study of different mechanisms involved in intercellular communication in normal cells and their alterations in tumor cells. Among the projects in progress are: i) Adenylation of plasma membrane proteins in normal and tumor hepatic cells, ii) Calcium signalling and regulation of the epidermal growth factor receptor by the calmodulin/ phosphocalmodulin system, iii) Regulation of cell proliferation by nitric oxide, iv) Role of gap junction channels in cell proliferation, and v) Antimitogenic effects of β -galactoside-specific lectins.

Department of Biochemistry and Genetics of Yeasts

Molecular analysis of ionic transporters in yeast.

Group Leader: Pilar Eraso

The molecular mechanism of glucose-induced activation of H⁺-ATPase is probably mediated by phosphorylation of the enzyme. The physiological role of a Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) was investigated by using specific calmodulin antagonists *in vivo* and *in vitro*. The results suggest a calmodulin-mediated regulation of the H⁺-ATPase independent of glucose-induced activation. To conclusively unravel the role of a this kinase, deletion mutants of the genes encoding CaM-kinases (CMK1, CMK2, RCK1 and RCK2) are being constructed.

Human CFTR protein and the yeast YCF1 protein belong to the ABC transporters family. Several cystic fibrosis-associated alleles of the CFTR were introduced into YCF1. The *ycf1* mutants have been analyzed at the phenotypic and biochemical level showing defects analogous to those seen in the CFTR. These studies indicate that YCF1 protein provides a good model system for the study of the structure-function relationship of CFTR.

Relationships between glycolytic flux and sygar effects in yeast

Group Leader: Carlos Gancedo

We have continued our study of mutations that suppress the toxic effects of sugars upon glycolytic mutants. We have identified the mutations in the gene *DGT1-1* and *BPCI-1* (alleles of *MTH1*).

We have characterized the hexokinases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica* and cloned their coding genes. We have also cloned the *PYC1* gene from *Pichia pastoris* and have isolated a suppressor of the *pyc1* phenotype.

Our laboratory has continued its participation in the Eurofan project for functional analysis of the yeast genome.

Regulation of the expression of the *FBPI* gene and catabolite repression in yeast

Group leader: Juana M. Gancedo

Research topics:

Characterization of elements which regulate *FBPI* transcription

Role of cAMP in catabolite repression

Galactose *versus* glucose signalling

Control of glycolytic flux

A functional analysis of the upstream activating sequences in the *FBPI* promoter has been carried out. We are investigating the mode of action of an upstream repressing sequence which is able in certain circumstances to act as activator of transcription. cAMP has been shown to repress to different degrees the synthesis of a variety of enzymes subject to catabolite repression. We have found that glucose signalling in yeast is only partially mimicked by galactose. Glycolysis in yeast operates near its maximal capacity and appears resistant to attempts to increase it.

Turnover of plasma membrane proteins in yeast. Mechanisms of endocytosis

Group Leader: Rosario Lagunas

Sugar transporters in yeast cells are degraded in the vacuole after internalization by endocytosis. The factors that govern endocytosis and degradation of these proteins are being investigated. Using the maltose transporter as experimental model we have shown that two enzymes, at least, of the ubiquitin pathway, an ubiquitin-ligase and an ubiquitin-hydrolase, are required for internalization of these proteins. In addition, we have shown that actin microfilaments are involved in this process whereas microtubules are not. Moderate concentrations of ethanol (2 to 6%, vol/vol) inhibit endocytosis of the transporters. The results show that this inhibition is due to alterations produced by ethanol in the organization of the plasma membrane. Apparently, endocytosis is particularly sensitive to these alterations as compared with other processes occurring at the plasma membrane.

Yeast Genes Functional Analysis

Group Leader: María Jesús Mazón

Six of the ORFs identified during the Yeast Genome Sequencing Project were disrupted and a basic phenotypic analysis was performed with the mutants. The results obtained allowed the identification of a gene, YGL142c, whose disruption is lethal and codes for a protein involved in the synthesis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. This gene is the structural and functional homolog of the human gene *PIG-B*.

We are studying the structure-function relationship of the CFTR protein using the yeast structural homolog protein, Ycf1p, as a model. To address the effect of PKA phosphorylation a glycine residue was substituted for the phosphorylatable Ser908. This mutation abolished the activity of the resultant protein although it was correctly localized to the vacuole. However the substitution of either aspartic or glutamic for Ser908 rendered a partially active Ycf1 mutant that was also correctly localized to the vacuole. We are also interested in the identification of sorting signals in Ycf1p that determine its transport to the vacuole as well as in the study of the secretory route used by this protein to reach the vacuole.

Molecular analysis of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*.

Group Leader: Francisco Portillo

Glucose triggers transcriptional and post-transcriptional mechanisms which increase the level and the activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. We have investigated the post-transcriptional activation by glucose of the enzyme and have found that Rsp5, an ubiquitin-protein ligase enzyme, Ubc4, an ubiquitin conjugating enzyme, and the 26S proteasome complex are implicated in this activation. These results suggest that activation of ATPase by glucose requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. This conclusion is supported by the fact that overexpression of the ubiquitin-specific protease Ubp2, which cleaves ubiquitin from its branched conjugates, inhibits this activation. We propose that glucose triggers degradation of an inhibitory protein resulting in the activation of the enzyme.

Department of Molecular Endocrinology

Expression patterns of genes regulated by thyroid hormone in the developing brain

Group Leader: Juan Bernal

The goal of our work is to identify and characterize brain genes under control of thyroid hormone. Among the most important and fundamental actions of thyroid hormones are those exerted on brain development and function. To gain insight into the molecular basis of thyroid hormone action in brain development, we started about ten years ago a systematic work aimed at the identification of thyroid hormone regulated brain genes. Among the 20 or so identified genes, we report here our work on RC3, SE6C and tubulin. RC3 encodes a neuron-specific, kinase C substrate that binds calmodulin in the absence of calcium and is involved in

synaptic plasticity, and dendritic spine formation and remodeling, memory, etc. The protein is extremely conserved across species. Thyroid hormone controls transcription of the gene in selected populations of cells in vivo and in neuronal cells in culture. Control of thyroid hormone is exerted both during development and in adult animals. We have identified a thyroid hormone responsive element in the first intron of the human gene. SE6C is a 4 kb mRNA expressed almost exclusively in the caudate nucleus. Thyroid hormone is essential for normal expression of this gene. We have recently isolated the full-length cDNA, which encodes a 345 aminoacids, novel member of the Ras family of GTP binding proteins. We are presently expressing the protein in order to produce specific antibodies and to perform functional analysis. The alpha isoform of tubulin is also under thyroid hormone control. Thyroid hormone downregulates the gene through an action at the transcriptional level. We have recently identified a T3 responsive element consisting of a direct repeat separated by three base pairs. This arrangement is typical of the vitamin D3 responsive elements. However, the tubulin T3RE is able to bind the RXR-T3R heterodimer and transduces thyroid hormone responses. Contrary to the usual position in the promoter region, this T3RE is located in the third exon of the gene. Results are under way to determine precisely the regional characteristics of T3 regulation of the gene by in situ hybridization and the role of the promoter sequences.

In addition to our studies on thyroid hormone-regulated genes, we have also examined the expression of the 5' type 2 deiodinase, the enzyme that converts T4 to T3 in the brain. We found that the mRNA is present in high amounts in the specialized glial cells named tanycytes, located in the third ventricle, which suggests that these cells are involved in the regulation of T3 concentration in the CSF and in the median eminence. On the other hand, in other parts of the brain D2 is located in the astrocytes, suggesting that T4 reaches these cells after crossing the blood-brain barrier, is converted to T3 in the astrocytes, and is then released for neuronal use.

Thyroid hormones at different stages of development

Group leader for maternal-fetal communication: G. Morreale de Escobar

Research topics: a) Thyroid hormones in early human embryonic compartments; b) Thyroid hormone status in premature infants; c) Alterations in fetal thyroid status, including cerebral T concentrations, in fetuses from mothers with the "low T3 syndrome" due to a maternal non-thyroidal illness (diabetes mellitus); d) Alterations of thyroid hormone transport, induced with a synthetic flavonoid, and consequences for the maternal and fetal thyroid hormone status; e) Effects of maternal treatment with TRH and glucocorticoids on fetal thyroid status in rats with and without nitrofen-induced pulmonary immaturity.

Group leader for extrathyroidal adaptations to thyroid hormone deficiency and excess: G. Morreale de Escobar

Research topics: a) Regulation of iodothyronine deiodinases by T4 and T3 in different tissues of the adult hypo, eu- and hyper-thyroid rat; b) Thyroid hormone status in thyroid hormone receptor β null mutant mice.

Group leader for iodine deficiency studies: Dr. F. Escobar del Rey Research topics: a) Situation of iodine nutrition in different areas of Spain; b) Iodine nutrition in schoolchildren of the Community of Madrid; c) Iodine deficiency in pregnant and lactating women; d) Experimental iodine deficiency disorders: threshold for brain damage; e) Brain damage in progeny of severely iodine deficient rats: delay in fetal brain maturation and seizure susceptibility.

Biology of erbA and related nuclear hormone receptors

Group leader: Alberto Muñoz

Research topics: a) Effects of erbA genes and thyroid hormone on glial and neuronal cells; b) Study of the nuclear receptors-AP-1 antagonism; c) Search for and study of brain genes regulated by thyroid hormone; d) Study of the antiangiogenic activity of nuclear receptors and thrombospondin-1

Our group is focussed on the study of the biology of the erbA genes encoding thyroid hormone (T3) receptors, and of related nuclear receptors such as those of glucocorticoids (GR), retinoic acid (RAR), and vitamin D3 (VitD3R).

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 neuronal (P) origin. On the other hand, we are searching for new genes regulated by c-erbA and its ligand T3 by differential display PCR.

In addition, we have studied the regulation by T3 of the prostaglandin (PG) D2 synthetase and tenascin-C genes. We have characterized a T3-regulatory element in the promoter region of the PGD2 synthetase gene, and in situ hybridization and immunohistochemistry analyses have confirmed the control by T3 in vivo. In the case of tenascin-C, a complex pattern of regulation has been found in the developing rat brain.

Recently, we have defined a novel mechanism for the anti-AP-1 activity of liganded nuclear hormone receptors. Hormone-bound receptors inhibit the JNK signalling pathway activated by either UV radiation or tumor necrosis factor- α . By blocking c-Jun N-terminal phosphorylation glucocorticoids, retinoids, thyroid hormone, and vitamin D3 may exert their antiproliferative, antiinflammatory and immunosuppressive activities.

Finally, we are initiating the analysis of the antiangiogenic action of thrombospondin-1 and of glucocorticoids and retinoids on cultured human and bovine microvascular endothelial cells.

Regulation of brown adipocytes proliferation and differentiation. Regulation of deiodinases by thyroid hormones.

Group leader : María Jesús Obregón

Research topics:

Our main interest is the study of the activation of brown adipose tissue, a highly thermogenic tissue. For this, we use primary cultures of brown adipocytes, and the pathways that lead to the activation of proliferation and differentiation are examined.

Proliferation of brown adipocytes in primary culture. Norepinephrine (NE) is able to potentiate the mitogenic effect of serum, growth factors, vasopresin and other mitogens as araquidonic acid and endothelin-1. The effects of NE seem to be mediated via PKC. The cells obtained are true adipocytes as express the differentiation marker: UCP.

UCP gene expression is regulated in brown adipocytes by NE, thyroid hormones, retinoic acid, insulin and glucocorticoids. Besides UCP mRNA expression, the regulation of UCP promoter is also studied.

Regulation of type II 5'Deiodinase (5'D-II) and 5 Desiodinase (5D) activity and mRNA in cultured brown adipocytes. 5'D-II is adrenergically stimulated by NE and T3 is required for such stimulation; on the other hand growth factors, thyroid hormones and NE induce 5D

activity and mRNA.

Regulation of Deiodinase activities in fetal rat tissues. Those studies are carried out mainly in situations of iodine deficiency or thyroid hormone substitutive therapy.

Regulation of transcription: Analysis of molecular events involved in the hormonal control and in the tissue-specific gene expression.

Group Leader: Pilar Santisteban

The goals of our work is to study the regulation of tissue-specific gene transcription. For this purpose, we have chosen the follicular thyroid cells as a model for study. Differentiation of these cells is controlled by a group of specific transcription factors (TTF-1, TTF-2 and Pax-8), which belong to the *homeo-box*, *fork-head* and *paired-box* families, control the expression of two thyroid-specific genes thyroglobulin and thyroperoxidase. We have identified the TTF-2 binding site as a hormone response element being the factor TTF-2 transcriptionally regulated by TSH/cAMP and insulin/IGF-I. However, the function of TTF-2 is dependent of the close position of an ubiquitous factor that we have identified as a member of the family of constitutive factors CTF/NF-1. TTF-1 and CTF/NF-1 interact and cooperate in the regulation of thyroperoxidase gene. The regulation of TTF-1 is much more complex, involving phosphorylation as the main mechanism controlling its activity. We have also studying the role of PKA, PKC and MAPK in TTF-1 activation/inactivation process. Since the knock-out mice for the above transcription factors, obtained in different laboratories, give a phenotype with thyroid alterations, we have started a new project studying the role of this transcription factors in human pathologies such as hypothyroidism, agenesis and ectopias. TTF-1 is also expressed in lung and is the main regulator together with HNF-3 of the surfactant protein gene expression. The function of these transcription factors in lung is another project of our interest.

The above study has been made in thyroid epithelia cells. Another thyroid cells type, are the parafollicular cells that are the responsible of the medullary thyroid carcinoma. In this cells we have show that the p53 locus is severely rearranged and the introduction of p53 induces cell-cycle arrest.

Another important model for study hormonal regulation of gene expression is the regulation of malic enzyme promoter by insulin and thyroid hormones. We have identified a response element for insulin. To this element different transcription factors are able to bind : Sp-1, Sp-3 and erg-1/NFG-IA. Sp-1 is a functional factors able to cooperate with members of the nuclear receptor family and erg-1 is induced by insulin. Finally, we have identified Xenobiotics Response Elements in the malic enzyme gene promoter that response positively to the induction of dioxin receptor in liver.

Department of Enzymology and Molecular Pathology

Mechanisms of control of carbohydrate metabolism

Group leader: Juan José Aragón

Our research is focused on the molecular and physiological bases of the function of enzymes involved in the regulation of carbohydrate metabolism. Structure-function relationship studies are carried out in eukaryotic phosphofructokinases, namely the C-isozyme from ascites tumor cells, the M-isozyme from human muscle and the non-allosteric isozyme from *Dictyostelium discoideum* by expression of their cDNA in yeast and specific manipulations of their sequences. Other studies are related to *i*) the interaction of tubulin with phosphofructokinase from rabbit muscle and *D. discoideum*, the latter of which has been found to play a role in microtubule dynamics; *ii*) the non-invasive evaluation of intestinal lactase activity *in vivo* by using 2-, 3- and 4-galactosyl-xyloses, with potential application to the diagnosis of the deficiency of this enzyme in humans, and *iii*) the glutamine and glucose metabolism in hybridoma cells

Characterization of Novel Human Genes And its Possible Involvement in Inherited Diseases.

Group Leaders: Antonio Coloma and Jesús Cruces

The activities of our group are focused in the field of Human Molecular Genetics, and our main interest is the characterization of novel human genes. Current studies deal with the analysis of the structure and function of:

- The gene *NRGN*, encoding neurogranin a neuronal protein with specific expression in the brain.
- The gene *POMT1*, encoding an O-mannosyl transferase which might be involved in early muscle system formation
- The genes contained in the deleted region of the Williams- Beuren Syndrome, a complex alteration of development affecting the nervous system and cardiovascular apparatus, as well as connective tissues.

Also, we are studying the organization of centromeric sequences from human chromosome 7 and their putative contribution to the function or/and structure of the centromere.

Control of expression and modulation of enzymatic activities in yeast and developing systems

Group Leader: Claudio Fernández de Heredia

Our main interest during the last two years has been centered in: a) study of the mutual interactions in the metabolism of mono- and disaccharides in *Saccharomyces cerevisiae* and b) characterization of enzymes acting on 2',3' cyclic nucleotides. In relation with the first subject, we have found that hexoses (galactose, mannose, fructose and their non-metabolizable structural analogs) interfere with the metabolism of maltose in *Saccharomyces cerevisiae* at two levels: transport of the

disaccharide inside the cell and phosphorylation of the glucose generate by intracellular hydrolysis of maltose. In relation with the second subject, we have partially characterized in *Fusarium culmorum* two phosphodiesterases which hydrolyze respectively the 2' or 3' ester bond of 2',3' cyclic nucleotides to give the corresponding nucleosides monophosphates.

Mechanism of Methotrexate resistance in murine L.L.A cell lines

Group leader: Pilar Llorente

Acquired resistance to MTX newer folate analogs under development will remain a major limitation to their effective clinical utility. One of the determinants of cytotoxicity shared by these drugs is the process of intracellular polyglutamylation synthesis mediated by the enzyme folylpolyglutamate synthetase (FPGS).

We have undertaken a study of the possible mechanism(s) of cellular resistance to MTX focusing in the properties of the FPGS activity in murine acute lymphoblastic leukemic cells, L5178Y, with different sensitivity to MTX and checking the FPGS as a new drug target in the parental and MTX resistant cells, evaluating previous isolation, characterization and synthesis of folate and MTX hydrolysis metabolites as FPGS inhibitors.

Metabolism and function of dinucleoside polyphosphates

Group Leaders: Antonio Sillero and M^a Antonia Günther

Nucleotide metabolism in brain. The IMP/GMP specific 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) has been purified to homogeneity from the cytosol of rat brain. The enzyme is activated by dinucleoside polyphosphates and by polyphosphates. These compounds are also positive effectors of the phosphotransferase activity of the enzyme.

Metabolism of 2',3'-dideoxynucleotides. 2',3'-Dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (ddNp4ddN) behave differently to the corresponding NTP and Np4N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterase. The possibility of using ddNp4ddN or Np4ddN as a source of the active retroviral agent ddNTP, for example in HIV infection, is outlined.

Mechanism of reaction of luciferase. The formation of dehydroluciferin (L) from luciferin (LH₂) in the reaction catalyzed by firefly luciferase (EC 1.13.12.7) has been studied. The E•LH₂-AMP complex may follow two different pathways: towards production of light and towards the synthesis of the E•L-AMP complex. This last step has an inhibitory effect on light emission as molecules of enzyme are trapped in a light unproductive complex. The effect of CoA and nucleoside 5'-triphosphates (NTPs) on light emission are quantitatively different. CoA combines with the L moiety of the E•L-AMP complex, yielding L-CoA, promoting liberation of free luciferase and increasing light yield. NTP reacts with the AMP moiety of the same complex generating adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside (Ap₄N) and, probably, the E•L complex, and scarcely increasing light production.

Synthesis of dinucleoside polyphosphates. Acyl CoA synthetase from *Pseudomonas* catalyses the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates.

Department of Structure and Function of Biomolecules

COT kinase regulates T lymphocyte activation

Group Leader: Susana Alemany

COT kinase has been related as a MAP kinase kinase kinase that play a role in T lymphomas development. We have recently shown that COT kinase regulates the transcription of IL-2 and TNF- α genes, by activating the AP-1 and NFAT response elements. This increase in the expression of these genes renders to an increase in the extracellular levels of these cytokines and can explain the role of COT kinase in T lymphocyte activation.

Proteasome modulation and autoimmune diseases

Group Leader: José G. Castaño

We are interested in the study of modulation of proteasome activity. We have found that several proteasome subunits are phosphorylated by casein kinase I and c-src, having identified the phosphorylated subunits by anti-subunit specific antibodies and demonstrated that the phosphorylation occurs both, in vivo and in vitro. We are also interested in the proteasome function in CNS proteolysis and have continued to characterise its involvement on the degradation of myelin basic protein. Another line of research with a protease from *E. coli* (EClpP), related in specificity to the proteasome, has allowed us the characterisation of specific antibodies against this *E. coli* protease in patients with primary biliary cirrhosis and we continued working with the study of the autoimmune response against the eukaryotic proteasome.

Magnetic Resonance in Medicine and Biology

Group Leader: Sebastián Cerdán

Our laboratory is developing novel Magnetic Resonance (MR) strategies to (i) understand the biological basis of contrast in MR images and its relationships with water metabolism in different cells and tissues (ii) asses quantitatively the metabolic interactions between neurons and glial cells under physiological or pothological situations, (iii) investigate the regulation of intra- and extracellular pH in tumors, (iv) develop automatic diagnostic MR procedures based in the use of artificial intelligence and (v) implement a novel series of contrast agents for the non invasive MR imaging of intra- and extracellular pH in non transparent samples.

Study of the function of casein kinase 1 from *Dictyostelium discoideum*

Group leader: Margarita Fernández

Cloning and expression of a casein kinase 1 from *Dictyostelium discoideum*..
Our main goal is to study the function of this kinase in *Dictyostelium* cells. We have

cloned and sequenced a casein kinase 1 from a *dictyostelium* cDNA library, this gene shows a high homology with other members of the casein kinase 1 family, in particular with those isoforms that present nuclear localization. We have generated antibodies against a truncated version of the protein produced in bacteria. Northern and western analysis indicate that this gene is expressed in vegetative as well as differentiated *Dictyostelium* cells, without significative changes in its expression through the *Dictyostelium* vital stages, suggesting that it could be an important protein for the life of this organism.

Immunofluorescence studies performed with the affinity purified antibody, suggest that the localization of the protein changes during the cell cycle and that might be involved in mitosis.

In order to investigate the function of the protein, we have made a construct in which the coding sequence has been interrupted with a gene that codify for a blasticidine resistance. We are currently analyzing, the transformants which growth in the presence of the drug.

Activation of MAP and Raf kinase and protein kinase C in response to different stimuli.

We had study the activation of MAP, Raf kinase and protein kinase C in response to different stimuli such as PDBu or IL2 in rat lymphoblasts. In the primary cultures these enzymes are not activated in response to IL2 but they are activated in response to the phorbol ester, which is a mitogen for these cells. The activation of the MAP kinase is the rate limiting step in the activation process, this activation is transient due to the presence of different protein phosphatases involved in its dephosphorylation and inactivation. We have been studying the dephosphorylation process and we have concluded that there are inducible as well as constitutive protein phosphatases involved in the process.

Regulation of the hepatic metabolism of methionine: structure/function relationships

Group Leader: María de los Angeles Pajares

The main interest of the laboratory is the study of the regulation of the liver methionine metabolism, as well as the structure/function relationships of several of the enzymes involved in it. For these purposes we prepare mutants of residues that seem to be important in the structure, or for the function of the enzymes of our interest. These mutants are used for structural studies after its characterization. Moreover, experimental models are prepared in order to study the influence of several metabolites in the function of the methionine cycle and its regulation.

Mitogenic Activities in the Peritoneal Effluent of Patients Treated with C.A.P.D.

Group Leader: Francisco Vara

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 Regulation of Gene Expression

Regulation of gene expression by nuclear receptors in pituitary and neuronal cells: interaction with other transcription factors and with mitogenic and neurotrophic factors.

Group Leader: Ana Aranda

The aim of our work is to analyze the molecular mechanisms by which the nuclear receptors cooperate with membrane receptors with tyrosine kinase activity to regulate the expression of genes involved in proliferation and differentiation in pituitary and neuronal cells. The interaction among different ligands of nuclear receptors with other transcription factors and growth factors to regulate transcription of the growth hormone, prolactin and the retinoid receptor RAR β 2 genes has been analyzed in pituitary cells. In PC12 and neuroblastoma cells, in which nuclear receptor ligands act in conjunction with neurotrophins to elicit differentiation and antimitogenic effects, the expression of the RAR β 2 gene, of components of the AP-1 complex, or of genes directly involved in cell cycle control (the *c-myc* oncogene, the CKI p27, cyclins and CDKs), has been analyzed. Finally, and since the human immunodeficiency HIV-1 virus causes relevant neurological effects, the role of the functional interaction between nuclear receptors and neurotrophic factors to activate HIV-1 gene expression in neuronal cells has also been analyzed.

Control Regulation Of The Paramyosin/Miniparamyosin And Troponin T Genes In *Drosophila*

Group Leader: Margarita Cervera

Muscle differentiation is performed through the combination of multiple molecular mechanisms, which includes differential expression of muscle protein genes and specific isoform generation. Transcription regulation of tissue-specific genes is regulated by enhancers and cis-acting regulatory regions or modules which interact with unique combinations of transcription factors in each cell type. Muscle gene regulation is different from housekeeping gene regulation, and the *Drosophila* paramyosin/ miniparamyosin gene, as well as the troponin T gene, are good model systems in order to clarify such regulatory mechanisms in *Drosophila* and in mammals, too. In addition, the analysis of the mPM promoter, which controls the expression of one of the few adult-specific muscle proteins, probably will allow us the identification and characterization of novel muscle transcription factors acting specifically in the adult stages. TnT and paramyosin are two contractile proteins localized in the same structure, the sarcomere, although in different filaments, and show the same temporospatial expression pattern. A comparison between the features of the regulatory elements acting in these two genes will permit us the searching of common elements which could be involved in the coordination of the expression of the components of a defined structure.

Regulation of the expression of mitochondrial genes

Group Leader: Carmen García-Vallejo

Our interest continues to be focused on the regulation of mitochondrial gene expression. At the moment, we are attempting the purification of the mitochondrial poly A polymerase which has not been identified in any system so far and, therefore, remains as a piece of the transcriptional machinery still to be characterized. The comparative initial characterization of an enzymatic preparation from the cytoplasm and another one obtained from purified mitochondria suggests that the poly A polymerases from the two compartments are different entities. Our aim is to clone and characterize the mitochondrial poly A polymerase.

To gain insight into the mechanisms that regulate mitochondrial gene expression, we are studying the expression patterns and steady-state levels of mtTFA, the only transcription factor described up to date in mammals, and two nuclear transcription factors, NRF-1 and NRF-2, on which the mtTFA expression is dependent, in the context of the mitochondrial gene expression of different tissues. We expect that the integrated analysis of all these data will allow us to better understand the role of the different transcription factors in the expression of the mitochondrial genes.

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 characterizing transcription factors involved in mitochondrial differentiation, and modifying *in vivo* mitochondrial DNA replication. 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

During the period covered by this report, our group has continued working on the different sublines started in the past, namely, a) on the purification and properties of Troponin proteins in *Drosophila* and other arthropods, b) on the epigenetic modulation of *Drosophila* and *Artemia* development and aging by alterations in environmental conditions including exposure to abnormal gravitational forces like those existing in Space and c) applications of Microwaves to Biological Technology. While these sublines will be actively pursued during the next research biennium, our previous line linking mitochondrial DNA to phylogenetic studies in *Artemia*. has being finished with the overall characterization in te World of the

different species in this *genus*.

Regulation of expression of the β -amyloid protein gene

Group Leader: Angel Pascual

β -amyloid protein is the major component of the senile plaques observed in the brains of humans with Alzheimer's disease. This 39-43 aminoacids peptide is a cleavage product of the different isoforms of the amyloid precursor protein APP, and an over-expression of this protein leads to a higher formation of the β -amyloid protein and is associated with neurotoxicity, thus contributing to the development of the pathology. Ligands of receptors with tyrosine kinase activity, as well as ligands of the nuclear receptor superfamily appear to regulate APP gene expression through yet unknown mechanisms. Using cultured cells of neural origin, we will analyze the molecular mechanisms by which these ligands regulate APP gene expression. Because most of these effects might be directly mediated throughout promoter elements, we will analyze the sequences involved in the regulation, as well as the contribution of the two AP-1 binding sites contained in the regulatory region of the gene.

Regulation of gene expression by thyroid hormone during development.

Group Leader: Ana Pérez-Castillo

Effect of congenital hypothyroidism on the morphology and function of brain mitochondria. We have recently demonstrated that thyroid hormone is an important regulator of mitochondrial gene expression during brain development. To gain further insights into the consequences of this regulation, we have performed functional and structural analysis of brain mitochondria from control and hypothyroid neonatal rats. Flow cytometry analysis showed a significant decrease in the mitochondrial transmembrane potential in hypothyroid animals as compared to controls, which was reversed after 48 hours, but not after 2 hours, of thyroid hormone administration, suggesting that the functional alterations observed are the consequence of changes in mitochondrial gene expression. Electron microscope analysis of cerebral cortex, striatum and hippocampus revealed marked differences in the morphology of neuronal mitochondria from control and hypothyroid neonates. Hypothyroid mitochondria presented a decrease in the area of the inner membrane plus cristae in all the areas studied, except for the hippocampal CA1 neurons and non-neuronal cell types. In addition, transfection experiments showed a direct regulation of mtTFA promoter activity by thyroid hormone, suggesting a possible nuclear mechanism for T3 action upon the mitochondrial genome. These observations provide a basis for the known biochemical action of thyroid hormone on brain development. Regulation by thyroid hormone of the C/EBP alpha and beta genes during liver development. The effect of thyroid hormone and retinoic acid on the expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) α and β was investigated in rat liver during development. Congenital hypothyroidism caused a significant decrease in both C/EBP α and C/EBP β gene expression at early stages of postnatal development. C/EBP α and β protein levels were also markedly diminished in hypothyroid neonates and the kinetics of induction of these proteins by thyroid hormone was faster than the one observed for the corresponding transcripts, suggesting a translational regulation of these genes. However, this regulation must be more complex since preliminary experiments using 1.2 kb of the promoter region of C/EBP α show a direct regulation by T3. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for ErbB receptors. Many cellular processes such as differentiation,

proliferation and cell death are mediated in part by signaling events involving members of the ErbB receptor tyrosine kinase family and their membrane-bound ligands the neuregulins. Since the structure of these neuregulins resembles those of membrane receptors we have studied whether these proteins could also act as receptors. We have found that the cytoplasmic domain of the transmembrane ligands NRG1 and NRG2 became phosphorylated on tyrosine residues after serum stimulation, which suggests that both neuregulins have receptor-like intrinsic signaling potential.

Transcriptional Regulation in Developmental Systems.

Group leader: Leandro Sastre.

Transcriptional regulation during the activation and early development of *Artemia franciscana* encysted embryos. *Artemia franciscana* cysts are obtained metabolically inactive in a cryptobiotic state. Under experimental conditions they can be activated and resume their metabolic activity and developmental program. Our group is interested in the elucidation of the mechanisms that produce the transcriptional arrest in the cysts and those implicated in its later activation. This problem is being approached through the study of the promoter region of some genes whose expression has been shown to be induced during this process. In particular, we are functionally characterizing the promoters of three actin genes and the two alternative promoters of the sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. We are also studying the transcription factors that binds to these promoters in cryptobiotic and developing embryos.

Structure and function of the Serum Response Factor (SRF) in *Artemia franciscana* and *Dictyostelium discoideum*. The SRF has been shown to be very conserved during evolution. In fact, its binding site, the Serum Response Element, is present in one of the *Artemia* actin promoters. However, while the SRF seems to participate in the regulation of cell proliferation in mammals, its has been shown to be required for the specification or differentiation of some cell types in *Drosophila*. This apparent paradox has motivated our interest in the study of this transcription factor in the crustacean *Artemia franciscana* and in a simpler model, the slime mold *Dictyostelium discoideum*. cDNA clones coding for the SRF homologues have been isolated from both organisms and being studied. Gene interruption experiments have shown that spore maturation is dependent on SRF in *D. discoideum*.

Department of Cellular Signaling

Role of Akt kinase in neuron survival induced by neurotrophins and G protein coupled receptors

Group Leader: Antonio Cuadrado

The nervous system is subjected to apoptotic and survival signals which drive its embryonic development and estress response. Akt, a Ser/thr protein kinase, appears to be a key element in the transduction of these signals. Based on our experience on lipid second messengers and signal transduction we are opening a lane of research on the role of Akt in signalling by NGF receptors (TrkA), with Tyr kinase activity, and by muscarinic receptors, coupled to trimeric G proteins. We are also analysing the efeotor mechanisms of Akt related

to sphingomyelin metabolism, and looking for relevant substrates for its antiapoptotic function. These studies are of interest in aspects of neuronal regeneration and neurodegenerative processes.

Hormonal Regulation of Metabolism

Group Leader: Juan Emilio Felú

We are interested in the study of the modulation of hepatic glucose production by insulin, glucose and sulfonylureas in the Zucker obese (*fa/fa*) rat, a genetic model of obesity. Our results indicate that the adaptation of key glycolytic enzymes, as well as the cellular concentration of F,2,6-P₂, to hyperinsulinemia present in this animal contribute to the resistance of gluconeogenesis to short-term modulation by insulin, glucose and sulfonylureas. We are also involved in a clinical program of biochemical and molecular diagnosis of inherited metabolic diseases of carbohydrate metabolism.

Cytokine signal transduction mechanisms: Prolactin

Group Leader: Jorge Martín-Pérez

Prolactin (PRL) is a cytokine exercising multiple biological functions throughout a dimer of a monomeric type I cytokine receptor. Therefore the prolactin receptor (PRLR) does not have any known enzymatic activity, however upon interaction with the hormone, the PRLR interacts and activates the Jak and Src family of tyrosine kinases that in turn induce tyrosine phosphorylation of cellular proteins including the receptor itself. By mutation of the rat PRLR long form we have been able to show that the association and activation of c-Src is independent of the Jak kinases and of the tyrosine phosphorylation of the receptor. We have evidences that phosphorylation of the PRLR is catalyzed by the Jak kinases.

To gain some understanding on the role of tyrosine phosphorylation of the receptor on the signal transduction mechanisms induced by PRL, we have produced a number of deletion and point-substitution (F/Y) mutants of the PRLR. Since we have observed that PRL induces both proliferation and differentiation of some hematopoietic cell precursors, we will use this model system to analyse the functionality of those mutants as well as the role of the Src family in the PRL signalling mechanisms.

Genetic approaches to the study of signalling pathways in mammalian cells in culture

Group Leader: Jaime Renart

Our group has two main research projects; one is the study of NMDA-type of glutamate receptors; the second is the characterization of the induction of apoptosis by PKC inhibition.

In the first project, we have expressed the NR1 and NR2A receptor subunits with the aid of recombinant vaccinia virus. We get with this system functional receptors that allow calcium influx dependent on receptor agonists and that induces cell death after 24 hr of treatment with NMDA. Antagonists of the NMDA receptor (DL-AP5, MK801) inhibit calcium influx and protect cells from death. Both subunits are N-glycosylated, but NR1 subunit is extremely sensitive to treatment with tunicamycin, being degraded in a short period of time. We are currently studying this degradation.

In the second project, we have found that inhibition of PKC in turn inhibits the stimulation of MAPK. This latter inhibition, however is not sufficient for apoptosis, as MAPK can be inhibited by other means (inhibiting MEK) without induction of apoptosis. In a cell line that overexpresses Bcl-2 and is resistant to apoptosis, we have found distinct effects of inhibitors of classic PKC (Gö6976) and all PKC (GF109203X): the former inhibits basal MAPK activity, but has no effect on the stimulation by phorbol esters; GF109203X, however, inhibits both basal and stimutable activity. Given the isoforms present in N2A cells (alfa, epsilon and zeta), these results demonstrate that PKC epsilon has a specific effect in Bcl-2 overexpressing cells. We are currently characterizing the involvement of other signaling pathways (PI3K, JNK, p38) in this apoptotic system.

In relation with the second project, we are studying the effect of Geldanamycin in different cell lines. This antibiotic has antitumor activity and is an inhibitor of hsp90. It has been shown that GA treatment destabilizes Raf-1. In N2A cells, GA induces differentiation; Raf-1 is degraded in 24 hr, and in this period MAPK activity raises (maximum at 5 hr) and then disappears after 24 hr; the same pattern is observed for Raf-1 protein. PC12 cells treated with GA are induced to enter apoptosis, but C2C12 cells differentiate, like N2A.

Regulation of nerve cells differentiation and neuro-specific promoters expression by nuclear receptors.

Group Leader: Angeles Rodríguez-Peña

The role of thyroid hormone and thyroid hormone receptor (T3R) 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. The specific role of each T3R isoform (a and b) has been studied in different cell lines. Expression of T3R impairs proliferation. Interestingly, the b isoform is stronger than a, and such effects correlated with the increase in the cell cycle inhibitor p27/kip1.

The activation of two neuro-specific promoters by nuclear receptors have been studied: the myelin basic protein promoter is activated upon stimulation with thyroid hormone and 9-cis retinoic acid independently and through different elements. The neurotrophin receptor trkB promoters have characterised and the effect of thyroid hormone on trkB expression during brain development studied. Lack of thyroid hormone increases the trkB transcripts levels, by increasing the transcription rate. The T3-dependent repression is mediated through interaction an array of T3RE half sites located downstream of the transcription start.

Intracellular signals and proto-oncogenes involved in the development of the inner ear

Group Leader: Isabel Varela

One of the most appealing systems to study embryonic development both at the cellular and at the molecular level is the developing vertebrate inner ear. In the last few years the signalling networks responsible for the induction, growth and differentiation of vertebrate inner ear have started to be unravelled. We are interested in the molecular mechanisms by which these signals initiate and pattern the vertebrate inner ear. In this context, our laboratory

is interested in studying the biological activity and mechanism of action of lipid second messengers that are derived from glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) and sphingolipids.

Recently, we found that IGF-I is a strong promoter of cell growth and morphogenesis for the developing inner ear. IGF-I modulates the hydrolysis of GPI leading to inositol-phosphoglycan (IPG) generation. The latter, can modulate the expression of *c-jun* and *c-fos* genes. Blockage of IPG generation abolishes IGF-I-induced cell proliferation and *c-jun* and *c-fos* expression. IGF-I and IPG are also involved in the modulation of cochleovestibular ganglia differentiation. We have developed the methodology to study the effects of overexpressing or blocking the action of proto-oncogenes and growth factors during chicken development by using retroviral vectors RCAS.

We are also investigating on the regulation of cell activation by sphingolipids. In particular, we are interested in the role of ceramides and ceramide phosphate in controlling cell proliferation and programmed cell death or apoptosis. Regulation of normal development involves a dynamic balance of the mechanisms regulating cell division, differentiation and death. We have investigated the signalling mechanisms involved in regulation of the balance between cell proliferation and apoptotic cell death in the otic vesicle. The sphingomyelin pathway signals apoptosis for nerve growth factor upon binding to p75 receptors. It is initiated by sphingomyelin hydrolysis to generate the second messenger ceramide. Nerve growth factor stimulates sphingomyelin hydrolysis and the concomitant ceramide release in organotypic cultures of otic vesicles. Both nerve growth factor and ceramide induce apoptotic responses to a different extent. Ceramide-induced apoptosis was suppressed by IGF-I and ceramide-1-phosphate protected the explants from apoptosis induced by serum withdrawal. Our results suggest that sphingomyelin-derived second messengers might be key modulators of programmed cell death during development.