

Presentación	3
Organigrama.....	6
1 - Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer	
Cano García, Amparo.....	14
Lacal Sanjuan, Juan Carlos	21
Perona Abellon, Rosario	28
Pestaña Vargas, Angel	32
Villalobo Polo, Antonio	36
2 - Departamento de Bioquímica y Genética de Levaduras	
Eraso Mazmela, Pilar	44
Gancedo Rodríguez, Carlos	47
Lagunas Gil, Rosario.....	50
Mazón Calpena, María Jesús.....	53
Portillo Pérez, Francisco	57
Sempere Couderc, Juana María.....	61
3 - Departamento de Endocrinología Molecular	
Bernal Carrasco, Juan.....	65
Crespo Baraja, Piero.....	71
Iglesias Vacas, Teresa	75
Jiménez Cuenca, Benilde	79
Morreale de Castro, Gabriela	80
Muñoz Terol, Alberto.....	88
Obregón Perea, María Jesús	96
Santisteban Sanz, Pilar	103
Vallejo Fdez de la Reguera, Mario	111
4 - Departamento de Enzimología y Patología Molecular	
Aragón Reyes, Juan José.....	115
Fernández de Heredia, Claudio	120
Günther Nonell, María Antonia	121
Llorente Rodríguez, Pilar	124
Sillero Repullo, Antonio	126
5 - Departamento de Estructura y Función de Biomoléculas	
Alemany de la Peña, Susana	131
Calés Bourdet, Carmela	133
Calvo López, Víctor	137
Cerdán García-Esteller, Sebastián.....	138
Fernández Martín, Margarita	144
González Castaño, José.....	145
Martín Pérez, Jorge	147
Pajares Tarancón, María Angeles	150
6 - Departamento de Regulación de la Expresión Génica	
Aranda Iriarte, Ana.....	154
Cervera Jover, Margarita.....	160
Cruces Pinto, Jesús.....	164

Indice

García Vallejo, Carmen	168
Garesse Alarcón, Rafael	171
Marco Cuellar, Roberto	176
Pascual García, Angel.....	179
Peral Fuentes, María Belén.....	182
Pérez Castillo, Ana	185
Sastre Garzón, Leandro	190
7 - Departamento de Señalización Celular	
Cuadrado Pastor, Antonio.....	196
Feliu Albiñana, Juan Emilio	199
Quintanilla Avila, Miguel.....	203
Renart Pita, Jaime	208
Rodríguez Peña, María Angeles	213
Varela Nieto, Isabel	217
Seminarios 2000 / 2001	223
Cursos 2000 / 2001	231
Producción científica	234

Presentación

El Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (IIB) es un Centro Mixto CSIC-UAM que se encuentra situado en el campus de la Facultad de Medicina. Este Instituto tuvo su origen en el Instituto de Enzimología que, en 1971, se trasladó desde el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) a la Facultad de Medicina de la recién fundada UAM, para hacerse cargo de la enseñanza de la bioquímica. Se constituyó entonces el Departamento de Bioquímica y se firmó el primer convenio CSIC-UAM. Posteriormente, en 1975 y también desde el CIB, se trasladaron a la Facultad los doctores Gabriella Morreale y Francisco Escobar del Rey con su grupo de Endocrinología Experimental. Posteriormente, en 1984, se creó el IIB como resultado de la fusión de este grupo y del Instituto de Enzimología.

En 1991, se inauguró el edificio propio del IIB y se firmó un convenio con la UAM que cubría, en igualdad de condiciones, la actividad del personal del CSIC y de los profesores del Departamento de Bioquímica que, en aquel entonces, procedían en su mayoría del CSIC, del grupo de Alberto Sols. Ese convenio perdió vigencia en 1993 como resultado de la aprobación de un nuevo convenio marco entre el CSIC y la UAM. Se iniciaron entonces conversaciones para un proyecto de Centro Mixto que englobaría al personal de ambas instituciones. En Junio de 1998 el CSIC y la UAM aprobaron el Convenio y se creó, como se conoce en la actualidad, el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Centro Mixto que integra al IIB del CSIC y al Departamento de Bioquímica de la UAM.

En el momento actual la plantilla del IIB consta de 37 investigadores del CSIC; 17 investigadores de la UAM, todos ellos profesores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina; 77 técnicos de apoyo a la investigación y más de 200 becarios pre- y postdoctorales. Además, cuenta con servicios de gerencia y administración, mantenimiento de equipos y edificios, almacén, biblioteca, esterilización y lavado, preparación de tampones y medios, cultivos celulares, radioprotección, secuenciación de DNA, bioinformática, animalario, microscopía electrónica, microscopía confocal y un laboratorio de NMR que muy pronto empezará a funcionar como laboratorio de referencia de la CAM.

El IIB tiene una floreciente vida científica que, como se puede ver en esta memoria, gira alrededor de más de 50 líneas de investigación en áreas punteras de la máxima actualidad. Además, desempeña una importante labor docente participando en varias licenciaturas, en programas teóricos de doctorado, en la formación práctica y teórica de doctores, y en la formación de estudiantes de

Formación Profesional acogiendo en sus laboratorios estudiantes en prácticas y organizando cursos subvencionados por la CAM. Sin duda alguna el IIB tiene un futuro muy prometedor porque, además de contar con un inestimable plantel de investigadores "senior" de probada calidad, ha tenido la oportunidad, tras la ampliación de sus dependencias, de incorporar 5 nuevos Científicos Titulares del CSIC y 2 Profesores Titulares de la UAM con excelentes curricula. Estos jóvenes científicos están ya contribuyendo a que la vitalidad del IIB esté asegurada por muchos años.

Deseo terminar manifestando mi agradecimiento a Juan Bernal, mi predecesor en el cargo, a Margarita Cervera, Vicedirectora, a Antonio Sillero, Director del Departamento, a los miembros de la Junta de Instituto y a los componentes de las comisiones que tan generosamente han colaborado con la Dirección. También mi agradecimiento muy especial a los componentes de los servicios generales que con su buen hacer contribuyen a que el IIB sea un lugar de trabajo muy grato y muy apreciado por la comunidad científica. También agradezco a Javier Merino la elaboración de esta memoria y a los miembros de la Comisión Científica, Ana Aranda, Amparo Cano, María J. Mazón, Leandro Sastre y Mario Vallejo, la recogida de los datos que figuran en ella.

Rosario Lagunas

Directora

Organigrama

Directora

Rosario Lagunas

Vicedirectora

Margarita Cervera

Gerente

Alfonso Vich

Departamentos de Investigación

Biología Molecular y Celular del Cáncer

Jefe de Unidad

Miguel Campanero

Investigadores

Amparo Cano

Juan Carlos Lacal

Ignacio Palmero

Rosario Perona

Angel Pestaña

Antonio Villalobo

Personal de Apoyo a la Investigación

Amparo Jiménez

Amalia Montes

M^a Angeles Ramos

Bioquímica y Genética de Levaduras

Jefe de Unidad

Juana M^a Sempere

Investigadores

Pilar Eraso

Carlos Gancedo

Francisco Portillo

M^a Jesús Mazón

Personal de Apoyo a la Investigación

M^a Isabel Bermúdez

Eulalia Morgado

Endocrinología Molecular

Jefe de Unidad

Mario Vallejo

Investigadores

Juan Bernal

Piero Crespo

Francisco Escobar

Teresa Iglesias

Benilde Jiménez

Gabriela Morreale

Alberto Muñoz

M^a Jesús Obregón

Pilar Santisteban

Personal de Apoyo a la Investigación

Socorro Durán

Margarita González

Eulalia Moreno

M^a Asunción Navarro

M^a Jesús Presas

Enzimología y Patología Molecular

Jefe de Unidad

Pilar Llorente

Investigadores

Juan José Aragón

Claudio F. Heredia

M^a Antonia Günther

M^a Rosa Sagarra

Antonio Sillero

Personal de Apoyo a la Investigación

M^a Luisa Argomaniz

Isabel de Diego

Valentina Sánchez

Estructura y Función de Biomoléculas

Jefe de Unidad

Carmela Calés

Investigadores

Susana Alemany

Victor Calvo

Sebastián Cerdán

Margarita Fernández

Jose G. Castaño

M^a Angeles Pajares

Jorge Martín Pérez

Francisco Vara

Personal de Apoyo a la Investigación

Francisco J. Garrido

Regulación de la Expresión Génica

Jefe de Unidad

Ana Aranda

Investigadores

Margarita Cervera

Jesús Cruces

Carmen G. Vallejo

Rafael Garesse

Miguel Manzanares

Roberto Marco

Angel Pascual

Belén Peral

Ana M^a Pérez

Leandro Sastre

Personal de Apoyo a la Investigación

Pilar Ochoa

Milagros Sánchez

Ana M^a Seguido

Aida Villa

Señalización Celular

Jefe de Unidad

Miguel Quintanilla

Investigadores

Antonio Cuadrado

Juan Emilio Felú

Jaime Renart

M^a Angeles R-Peña

Isabel Varela

Personal de Apoyo a la Investigación

M^a Carmen Moratilla

Servicios de Gestión y Administración

Gerente

Alfonso Vich

Gerente adjunto

M^a Elena Asensio

Secretaria de Dirección

Rosario Agüero

Habilitado-Pagador

Jesús Rodríguez

Administración

Carmen Moreno
Manuela Mingot

Almacén

Joaquín Oliva
José V. Ruiz-Peinado

Biblioteca

M^a Paz Langa

Correo

Manuel Gallardo

Recepción y Telefonía

Juana de la Rosa
Gabriel Barón

Secretaría de Bioquímica

José Pérez
Ana Sánchez

Servicios Técnicos

Animalario

Fernando Núñez
Pablo Señor
Miguel Marsá
Carmina Criado

Bioinformática

Javier Merino
José M^a Gutierrez

Cultivo de Células y Preparación de medios

Ana Gutierrez
M^a Carmen Luengo
M^a Rosa Arregui
Gemma Luengo

Dibujo y Delineación

Javier Pérez

Fotografía

Antonio Fernández
Ricardo Uña

Lavado de Material

Silvia Cuenca
Manuela Rodríguez-Barbi
Adela Ruiz-Peinado

Mantenimiento

Roberto López
Angel García
Ramón Navares
Rafael Vara

Protección Radiológica

M^a Teresa Macías
Raquel Pina
Cristina Requejo

Secuenciación

Gemma R.-Tarduchy
Concepción Santiago

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

Regulación de la expresión de cadherina E y de la señalización de β -catenina durante la progresión tumoral

Investigador principal	Cano García, Amparo, Catedrático UAM
Investigadores Visitantes	Islas Mendoza, Socorro (desde diciembre 2000 hasta 2000)
Becarios Postdoctorales	Espada Regalado, Jesús(desde 2000 hasta septiembre 2001) Pérez Moreno, Mirna Alicia(desde 2000 hasta febrero 2001)
Becarios Predoctorales	Bolós Fernández, Victoria(desde 2001) Cubillo de Olazabal, Eva(desde octubre 2001) Holt , Liam(desde octubre 2000 hasta agosto 2001) Olmeda Casadomé, David(desde 1999) Peinado Selgas, Hector(desde octubre 1999)
Personal de Apoyo	Montes Martín, Amalia
Estudiantes de Licenciatura	Cubillo de Olazabal, Eva(desde octubre 2000 hasta junio 2001) Bolós Fernández, Victoria(desde octubre 1999 hasta junio 2000)
Colaboraciones	Portillo Pérez, Francisco Muñoz Terol, Alberto(desde junio 2000 hasta marzo 2001) Nieto, Maria Angela. Instituto Cajal. CSIC. Madrid Fabra, Angels. Instituto de Recerca Oncologica (IRO-COM), Barcelona Ramón y Cajal, Santiago. Hospital Puerta de Hierro, Madrid Palacios, José. CNIO. Madrid Quintanilla Avila, Miguel González-Mariscal, Lorenza. CINVESTAV. México.(desde mayo 1999)

Lineas de Investigación

Regulación de la expresión de cadherina E en la progresión tumoral.

Caracterización de represores transcripcionales.

(M.A. Pérez, H. Peinado, L. Holt, A. Montes, F. Portillo, M. A. Nieto , J. Palacios , A. Fabra , A. Cano)

El proceso de invasión tumoral de carcinomas implica la pérdida de interacciones intercelulares y la adquisición de propiedades migratorias. Estos procesos están frecuentemente acompañados de cambios dramáticos en el fenotipo celular, conocidos como transiciones epitelio-mesénquima (TEM). La cadherina E (CD-E) constituye el principal sistema de adhesión intercelular en tejidos epiteliales y su pérdida de expresión o función ocurre durante la invasión tumoral. Actualmente la CDE está considerada como un gen supresor de invasión. La caracterización de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de CD-E son de vital importancia para avanzar en el conocimiento del proceso invasivo y en la búsqueda de nuevas terapias anti-tumorales. Nuestros estudios previos sobre la regulación de la transcripción del gen de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón mostraron que la expresión del gen CD-E, está regulada por una combinación de factores activadores que actúan sobre el promotor basal y de factores inhibidores que interaccionan con un elemento palindrómico, E-pal, (localizado en la posición -76 a -88). La utilización de la técnica del híbrido sencillo de levadura, nos permitió aislar varios factores de transcripción por su interacción específica con el elemento E-pal: el factor Snail, de la familia de dedos de zinc, representado en el 49% de los clones aislados, y dos factores de la familia bHLH: E47 (representado en el 32% de los clones) y E2-2A (representado en el 12% de clones). La caracterización posterior de Snail y E47 ha permitido identificarlos como potentes represores transcripcionales de la expresión de CDE, por unión directa al elemento E-pal del promotor. La expresión ectópica de Snail o E47 en células epiteliales induce una dramática TEM concomitante con la pérdida de expresión de CD-E y la adquisición de propiedades invasivas y tumorogénicas. El análisis de la expresión endógena de Snail y E47 en una colección de líneas de carcinomas murinos y humanos ha mostrado una correlación inversa con la expresión de CD-E y una asociación directa con sus propiedades invasivas y metastáticas. La correlación inversa entre la expresión de CD-E y Snail también se ha observado en tumores murinos y humanos. Estos resultados indican que Snail y E47 inducen la TEM que ocurre durante la invasión tumoral a través de la represión de la expresión de CD-E, y abren nuevas perspectivas para el diseño de agentes anti-invasivos. Recientemente, hemos caracterizado la participación de Slug, otro miembro de la familia Snail, como represor de CDE e inductor de TEM cuando se sobreexpresa en células epiteliales. Interesantemente, los estudios de afinidad de Snail, Slug y E47 por el elemento E-pal del promotor de CDE indican que la afinidad de unión de Snail es al menos un orden de magnitud superior a la de Slug, e inferior a la de E47 lo que sugiere una acción diferencial de los tres factores en función del contexto celular. Actualmente se está procediendo a la caracterización funcional del mecanismo de represión ejercido por los tres factores sobre el promotor de CD-E. Los resultados

obtenidos hasta la fecha indican que los factores de la familia Snail ejercen su acción represora por reclutamiento de actividades histonas deacetilasas (HDCAs). Por otra parte, los estudios iniciales sobre el factor E2-2A, indican que actúa como un represor de potencia moderada sobre el gen de CDE, tanto en estudios de transfección transitoria como estable. El análisis de la expresión de ambos factores bHLH en el desarrollo embrionario temprano de ratón apoya, asimismo, un papel de los mismos en las TEMs que ocurren en ambas situaciones. Actualmente, estamos procediendo a la caracterización funcional de los dominios de E47 y E2-2A implicados en su actividad represora, a la búsqueda de los factores con los que dimerizan ambos factores y al estudio de su mecanismo preciso de represión transcripcional. La aparente participación de diferentes represores en la regulación de la expresión de CDE plantea la existencia formal de una posible relación funcional entre ellos. Nuestra hipótesis actual es que Snail puede actuar como un represor de CDE en las etapas iniciales de invasión tumoral, mientras que E47, E2A y Slug pueden actuar durante las etapas posteriores de invasión, ayudando a mantener el fenotipo migratorio de las células tumorales. Uno de los abordajes que estamos llevando a cabo para abordar esta hipótesis se basa en la identificación de los genes diana de los diferentes factores, utilizando la metodología de RAP-PCR (para análisis de células de origen canino que expresan establemente los diferentes factores) y de macro y microarrays para células murinas. Para estas últimas aproximaciones se está procediendo a la obtención de sistemas de expresión inducibles de los diferentes factores. Ambos abordajes, nos permitirán además realizar un estudio comparativo de los genes diana primarios (sistemas inducibles) vs secundarios (sistemas estables) de los diferentes factores. Adicionalmente, se está procediendo al análisis de la regulación de la expresión de Snail, a través de la caracterización de las regiones reguladoras del promotor de gen murino y al estudio de la influencia de factores de crecimiento, TGF β y FGF, en la regulación de su expresión. Adicionalmente, se está procediendo a analizar la expresión de Snail y de E12/E47 en de carcinomas murinos y biopsias de carcinomas humanos con el fin de evaluar su posible utilidad como marcadores de progresión tumoral.

Modulación de la señalización de β -catenina en la progresión tumoral.

(J. Espada, D. Olmeda, A. Cano)

La actividad funcional de la cadherina E depende estrictamente de la interacción del dominio citoplásmico de la molécula con el citoesqueleto de actina, a través de su asociación con una serie de proteínas citoplásmicas, denominadas cateninas: α -, β -, g-catenina (esta última idéntica a plakoglobina). Adicionalmente, β -catenina citoplásmica es un potente efector de la vía de señalización de Wnt, teniendo la capacidad de translocarse al núcleo y de interactuar con factores de

transcripción de la familia Lef-1/TCF, donde regula la expresión de genes implicados, entre otros procesos, en proliferación celular (como ciclina D1). La regulación de los niveles citoplásmicos y de la estabilidad metabólica de β -catenina dependen de su fosforilación por la quinasa GSK-3 β y de su interacción en un complejo multiproteico donde participa la proteína supresora de tumores APC, GSK-3 β y axina. En ausencia de señal, la formación de este complejo promueve la degradación proteolítica de β -catenina citoplásmica por la vía del proteasoma, mientras que en presencia de Wnt se inhibe la actividad de GSK-3 β , impidiéndose la formación del complejo de degradación y promoviéndose la estabilización metabólica de β -catenina y su translocación nuclear. Nuestros estudios previos pusieron de manifiesto que H-ras oncogénico induce la desorganización de los complejos de adhesión en los contactos célula-célula y la relocalización citoplásmica de β -catenina. Los efectos inducidos por V12H-ras, dependen de su efector fosfoinositol-3-OH-quinasa (PI3K) y se acompañan de la pérdida de interacción β -catenina/APC, de la estabilización metabólica de β -catenina y de la aparición de un complejo β -catenina/PI3K. Estos resultados indican que la activación oncogénica de H-ras induce la capacidad señalizadora de β -catenina, por una vía independiente de Wnt/GSK-3 β y en la que participa el efector de H-ras PI3K. La asociación β -catenina/PI3K incide directamente en la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/Lef-1, y nuestros resultados actuales indican que la translocación de un complejo β -catenina/p85 α al núcleo es suficiente para incrementar la actividad transcripcional de los complejos β -catenina-Lef-1/TCF en varios órdenes de magnitud. Por otra parte, los estudios realizados sobre los niveles de β -catenina citoplásmicas en relación con el ciclo celular han puesto de manifiesto que existe un nivel de regulación asociado a la transición G2/M del ciclo celular, donde los niveles de β -catenina libres (no asociados a APC) se incrementan de forma notable, descendiendo de nuevo abruptamente durante la fase M e inicio de G1 subsiguiente. La regulación de los niveles de β -catenina durante esta fase del ciclo celular parece ser un requerimiento estricto ya que el mantenimiento de altos niveles de β -catenina (mediante la inhibición de GSK3 β , o la expresión de formas mutantes de β -catenina) lleva a la detención del ciclo celular y dirigen a las células hacia apoptosis. Estos estudios han mostrado, por otra parte, una interesante acumulación de APC en los centrosomas, al final de la fase G2, donde muestra una fuerte colocalización con el MTOC (centro organizador de microtúbulos), y con g-tubulina, sugiriendo un papel adicional para este factor. Actualmente, estamos investigando la implicación de otros reguladores del ciclo celular en relación con este proceso.

Análisis de la unión estrecha durante la progresión tumoral.

(M.A. Pérez, S. Islas , L. González-Mariscal , A. Cano)

La unión estrecha es el sistema de adhesión intercelular que regula en las células epiteliales, la polaridad celular y permeabilidad paracelular. Su organización funcional está mediada por proteínas transmembrana específicas (occludina, claudinas) asociadas a una serie de proteínas citoplásmicas (ZO-1, ZO-2, ZO-3) y al citoesqueleto de actina, y depende estrictamente de la existencia de uniones adherentes funcionales mediadas por los complejos cadherina E/cateninas. En este contexto, se ha iniciado el estudio de la organización estructural y funcional de la unión estrecha en relación con la progresión tumoral, utilizando el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. Se está procediendo a analizar la expresión de los diferentes componentes de este sistema de adhesión y de su organización en función de la activación del oncogen H-ras en queratinocitos murinos. Asimismo, se está analizando la influencia de factores represores de la expresión de CDE (Snail, E47) en la expresión y/o organización funcional de las uniones estrechas.

Estudio del gen E1A de adenovirus como supresor tumoral y su utilidad en terapia génica.

(A. Cano, D. Olmeda, A. Montes, A. Fabra , S. Ramón y Cajal)

Siguiendo la colaboración establecida en años anteriores con el grupo del Dr. S. Ramón y Cajal y la Dra. A. Fabra se está analizando la capacidad anti-metastásica del gen E1A de adenovirus, en sus versiones 12S y 13S, en diferentes líneas de carcinomas murinos y humanos. Actualmente, y en el contexto de un proyecto conjunto, se está procediendo a analizar la influencia de ambas versiones del gen E1A en la modulación de la expresión de CDE y de los represores transcripcionales identificados en nuestro grupo.

Publicaciones

Cano, A., Pérez, M.A., Rodrigo, M.I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., Nieto, M. A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2 76-83.

Pérez, M.A., Locascio, A., Rodrigo, M.I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 276 27424-27431.

García, H., González, J.M., Espada, J., Berciano, M. T., Puig, I., Baulida, J., Cano, A., Cano, A., García de Herreros, A., Lafarga, M., Muñoz, A. (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154 369-387.

Financiación

Evaluación de la implicación de plakoglobina en la progresión de carcinoma de mama. Relación con APC y con un potencial marcador de invasión y migración, Slug (08.1/0020.01/1997) financiado por Comunidad de Madrid. Años 1998-2001

Adhesión celular y progresión tumoral. Señalización mediada por β -catenina/plakoglobina y su relación con la adhesión mediada por cadherina E (SAF98-0085-C03-01) financiado por Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. Años 1998-2001

Caracterización de proteínas de la unión estrecha en queratinocitos epidérmicos murinos y análisis de su posible participación en la transfromación celular (*Acción Integrada Hispano-Mexicana, 99MX0011*) financiado por CSIC-CONACYT. Años 1999-2000

Identificación de factores de transcripción que regulan la expresión de cadherina E. Evaluación de su implicación en el proceso de invasión tumoral (08.1/0024.1/99) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2000-2000

Caracterización funcional de factores de transcripción implicados en la invasión tumoral (08.1/0055.1/2000) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2001-2002

Papel del factor de transcripción A1/E47 de la familia bHLH en la invasión tumoral. Evaluación de su utilidad como marcador de progresión tumoralde (01/1174) financiado por Instituto de Salud Carlos III. FIS. Años 2001-2003

Supresión del fenotipo metastásico en carcinomas de mama, colon y piel mediante terapia génica con el adenovirus 5 E1A y sus mutantes. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares responsables (*Areces 99. Inv. Pral: Dra. A. Fabra*) financiado por Fundación ramón Areces . Años 1999-2001

Patentes

Snail, new tumoral progression marker and target of new antitumoral compounds WO 200102860 A1 20010111 (WO 0102860)

Palabras Clave

Cadherina-E, Invasión tumoral, Represión transcripcional, Snail, E47, β -catenina, PI3K, APC, Uniones estrechas, E1A y terapia génica

Oncogenes de la superfamilia Ras y diseño de nuevos fármacos antitumorales

Investigador principal	Lacal Sanjuan, Juan Carlos, Profesor de Investigación
Becarios	Pilar Fernández Valerón
Postdoctorales	Luisa Lucas Parras (hasta julio 2000)
Becarios Predoctorales	Agustín Rodríguez González Ana Ramírez de Molina Verónica Penalva Ambrona Salvador Aznar Benitah Félix Fernández Martínez
Personal de Apoyo	María Angeles Ramos García Mónica Bañez Coronel Ruth Gutiérrez Luque
Colaboraciones	Antonio Espinosa Ubeda (Dpto. Química Médica, Univ. de Granada) Yolanda Martín Sánchez-Cantaliejo (Univ. Europea de Madrid) Rosario Perona Abellón (Instituto de Investigaciones Bimédicas, Madrid) Miguel Fernández Braña (Univ. San Pablo CEU, Madrid)

Lineas de Investigación

Regulación de PLD y ChoK y su participación en procesos de carcinogénesis humana

(A. Rodríguez, A. Ramírez, M. Bañez, M. A. Ramos, F. Fernández, L. Lucas, JCLaca)

Nuestro grupo ha demostrado la importancia de la alteración de rutas de señalización mitogénicas relacionadas con el metabolismo de fosfolípidos en la carcinogénesis humana. Dentro del grupo de enzimas relacionadas con la generación de segundos mensajeros lipídicos, hemos identificado la fosfolipasa D (PLD) y la colina quinasa (ChoK), responsable de la generación de fosforilcolina, como enzimas claves en la transformación mediada por oncogenes. En estudios previos hemos sintetizado diversos derivados con potente actividad *ex vivo* e *in vitro* contra la ChoK, de los cuales los más activos son antiproliferativos para células en cultivo y se comportan *in vivo* como antitumorales. El conocimiento

sobre los mecanismos de regulación normal del enzima ChoK y su alteración tras la transformación, es todavía limitado. Actualmente estamos profundizando en el estudio de la regulación del enzima ChoK y su participación en el proceso de carcinogénesis en tumores humanos a través de las siguientes líneas: - Estudio de los mecanismos de regulación del enzima ChoK en condiciones normales tras la estimulación por factores de crecimiento en células humanas primarias y células inmortalizadas no tumorigénicas. - Alteraciones de la regulación de ChoK tras la transformación tumoral. Estos estudios se realizarán en líneas celulares derivadas de tumores humanos. - Análisis de los niveles del enzima ChoK así como de su actividad en diversos tumores humanos y en líneas tumorales establecidas. Correlación con mutaciones genéticas. - Correlación entre niveles de actividad ChoK y la respuesta a fármacos antitumorales convencionales y de diseño (inhibidores de la ChoK).

Inhibidores de colina quinasa como antitumorales

(A. Rodríguez, M. Bañez, M. A. Ramos, A. Espinosa, Y. Sánchez, M. Fernández, JCL)

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la ChoK es una nueva diana terapéutica prometedora para el diseño de nuevas familias de antitumorales y por ello hemos definido moléculas capaces de interferir con su actividad. De entre una gran variedad de inhibidores potenciales, hemicolinium-3 (HC-3) ha mostrado la mayor selectividad. HC-3, un homólogo de la colina con una estructura bisfenólica, ha sido descrito como un inhibidor de la ChoK con una IC50 de 57 nM. Sin embargo, HC-3 es un potente paralizante respiratorio, y por tanto no es un buen candidato para ser utilizado en la clínica. A pesar de sus características negativas, hemos utilizado HC-3 como una estructura modelo para el desarrollo de moléculas inhibitoras de la ChoK más activas y específicas. El programa consistió en el diseño y análisis de nuevos inhibidores del enzima. En primer lugar se estableció como método de cribaje el efecto inhibitor sobre la ChoK purificada. Los que resultaron más potentes, se analizaron para su posterior caracterización. El segundo cribaje se realizó respecto a la capacidad de los compuestos para inhibir el enzima en células enteras. Por último, la capacidad inhibitoria sobre la proliferación celular y su efecto como antitumorales en ratones atómicos constituyeron los últimos pasos en el proceso selectivo. De un total de más de 500 compuestos analizados, se han seleccionado un grupo de 35 moléculas con una potente actividad antiproliferativa en células enteras, con un aumento de la actividad de hasta 2.500 veces, relativas al HC-3. Una estrecha relación entre estructura y función de los compuestos analizados ha permitido una mejor comprensión de la interacción específica de los inhibidores con el enzima. De todos los compuestos seleccionados, cinco han mostrado actividad antitumoral

frente a tumores murinos (P388) en el que se ha mostrado un aumento de vida (increased life span, ILS) de al menos 125%. Por último, la actividad antitumoral distal frente a tumores humanos HT-29, y A431 se ha analizado para dos de estos compuestos con resultado positivos. Los resultados obtenidos demuestran una inhibición de hasta un 80% durante el desarrollo del experimento (10 semanas). El resto de compuestos seleccionados está en fase de estudio en relación a su toxicidad y actividad antitumoral

GTPasas Rho en transformación celular y apoptosis

(S. Aznar, P. Fernández Valerón, L. Fernández, R. Perona, J.C. Lacal)

Nuestro grupo ha demostrado que proteínas Rho inducen la activación de factores de transcripción relevantes para la regulación de procesos de transformación y apoptosis como NF- κ B, SRF, y Stat3. Además, hemos demostrado que bajo determinadas circunstancias, inducen la síntesis de Fas-L con la consiguiente inducción de apoptosis. Actualmente hemos iniciado dos proyectos en paralelo que han generado resultados preliminares de gran relevancia. Por una parte, hemos observado que las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42 inducen la activación transcripcional de otro miembro de la familia de factores de transcripción, Stat5 en un sistema celular epitelial (MDCK, células epiteliales de perro). Stat5 se ha relacionado con las respuestas inflamatoria e inmune y también en desarrollo, apoptosis y tumorigénesis. En segundo lugar, hemos identificado una diana transcripcional que podría estar relacionada con la actividad oncogénica de las proteínas Rho. La expresión de proteínas Rho activadas en diversos sistemas celulares inducen un drástico aumento de Cox-2 (Ciclo-oxigenasa 2). Cox-2 es una prostaglandina-sintasa involucrada en las respuestas inflamatoria e inmune. Sin embargo recientemente se ha demostrado una clara relación entre los niveles de expresión de Cox-2 y la formación de diversos tipos de tumores humanos, con especial relevancia en la angiogénesis y la aparición de metástasis. Estos sorprendentes resultados han conducido a que varios inhibidores de Cox-2 estén actualmente en ensayos clínicos como nuevos agentes antitumorales y antimetastásicos.

Basados en estos resultados, nuestro grupo está investigando los siguientes aspectos:

- Dilucidación de los mecanismo de regulación de las dos isoformas de Stat5 (Stat5a y Stat5b) por proteínas Rho y su posible contribución a la transformación y metástasis, o la inducción de apoptosis.
- Estudio de los mecanismos de regulación de Cox-2 por las proteínas Rho desde el punto de vista de su posible regulación transcripcional utilizando factores de

transcripción ya descritos por nuestro grupo (Stat3, Stat5, NF-kB, SRF) y por otros grupos (AP1, ATF2).

- Efecto de inhibidores de Cox-2 en el crecimiento in vivo de células humanas transformadas por genes rho activados.

Publicaciones

Lucas L., del Peso L., Rodríguez P., Penalva V. and Lacal J.C. , Hernández-Alcoceba R., del Peso L, and Lacal J.C. (2000). Ras protein is involved in the physiological regulation of phospholipase D by platelet derived growth factor. *Oncogene* 19: 431-437. 19 431-437.

Hernández-Alcoceba R., del Peso L, and Lacal J.C. (2000). Ras family of GTPases in cancer cell invasion. . *Cellular and Molecular Life Sciences* . 57 65-76.

Embade N., Valerón P.F., Aznar S., Lopez-Collazo E, and Lacal J.C. (2000) (2000). Apoptosis induced by Rac GTPase correlates with induction of FasL and ceramides production. *Mol. Biol. Cell.* 11 4347-4358.

Lucas L., Hernández-Alcoceba R., Rodríguez P., and Lacal J.C. (2001). Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. *Oncogene.* 20 1110--1117.

Lacal J.C. (2001). Choline kinase: a novel target to search for antitumor drugs. *IDrugs.* 4 419--426.

Aznar S. and Lacal. J.C. (2001). Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Letters.* 165 1--10.

Campos J., Nuñez M.C., Rodríguez V., Entrena A., Hernández-Alcoceba R., et al (2001). LUMO Energy of model compounds as an index for the inhibition of choline kinase: chemical meaning. *Eur. J. Med. Chem.* 36 215-225.

Ramírez de Molina A, Rodríguez-González A., and Lacal J.C (2001). Targeting new anticancer drugs within signalling pathways regulated by the Ras GTPases superfamily. *Int J Oncol.* 19 5-17.

Aznar S., Lacal J.C. (2001). Searching new targets for anticancer drug design: the families of Ras and Rho GTPases and their effectors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* . 67 193-234.

Ramírez de Molina A., Rodríguez-González A., Penalva V., Lucas L, Lacal JC (2001). Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten- and N-ras transformed cells . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* . 285 873-879.

Falta indicar los autores (2001). Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of Stat3 transcription factor is involved in RhoA GTPase oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell.* 12 3282-3294.

Lacal J.C. (2000). Sistemas de Transmisión de señales. En: *En Manual de Oncología Clínica y Molecular.* (R. Rosell, A. Abad, M. Monzó, A. Barnadas eds.). ARAN Editores, Madrid,

Lacal J.C. (2000). GTPases in cancer. En: *Cancer Research - An Encyclopedia Reference.* (Schwab M. eds.). Springer,

Campos J., Núñez MC, Khaless F, Hernández-Alcoceba R, Rodríguez-González A et al (2001). From "me-too" to QSAR-derived choline kinase inhibitors: a modern and promising chemotherapy. *Recent Res. Developm. Med. Chem.*

Lacal, J.C. (2001). Inhibidores de la transmisión de señales. En: *Curso de Formación Continuada en Oncología Médica.* (E. Díaz-Rubio, JA Moreno Nogueira, A. Cervantes Ruipérez eds.). You & US, Madrid,

Lacal J.C (2001). El diseño inteligente de nuevos fármacos antitumorales: una promesa hecha realidad. *Hematología, Citocinas, Inmunoterapia y Terapia Celular.* 3 157-174.

Lacal J.C. (2001). Intelligent drug design come of age: STI571 as the start of a new era in cancer research and treatment. *Rev. Oncología* 3, 229. 3 229.

Tesis Doctoral

Luisa Lucas Parras

"Fosfolipasa D es un efector fisiológico de proteínas RAS alterado tras la transformación oncogénica". Universidad de Alcalá. Facultad de Farmacia. 2000. Director: Juan Carlos Lacal. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Diseño de compuestos con actividad antitumoral que interfieran con el sistema de transmisión de señales inducida por oncogenes (*SAF98-0112-C02-01*) financiado por CICYT. Años 1998-2000

Análisis funcional de la muerte inducida por Rho y Gas1: implicación en neuropatologías degenerativas humanas (*2FD97-0647*) financiado por FEDER. Años 1999-2001

Diseño de compuestos con actividad antitumoral que interfieran con el sistema de transmisión de señales inducida por oncogenes (*08.1/0045/98 1/1*) financiado por CAM. Años 1999-2000

Alteraciones de la transmisión de señales inducida por genes rho, rac y cdc42 en progresión tumoral y resistencia a quimioterapia (*99/0817*) financiado por FIS. Años 1999-2001

Evaluación de compuestos in vitro, ex vivo y en un modelo animal de agentes farmacológicos frente a ChoK financiado por Bristol Myers Squibb. Años 1999-2000

Diseño de compuestos que inhiban la producción de fosforilcolina con actividad antitumoral (*2FD1997-1569*) financiado por FEDER. Años 2000-2001

Identification of Novel Targets for Cancer Treatment financiado por Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research Penzberg . Años 2000-2002

Regulación de la colino quinasa y su participación en procesos de carcinogénesis humana (*SAF2001-2042*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología . Años 2001-2003

Patentes

Derivados de 4-4'-Bipiridil-2-2'-bisoxazoles y 4-4'-bipiridil-2-2'-bistiazoles como agentes antineoplásicos
200101818

Premios

Mención de honor a la mejor comunicación. ECCO-11. Organised by FECS, Lisbon 21-25 october, 2001. S. Aznar, P. F. Valerón, S. Victoria del Rincon, L. Fernández Pérez, R. Perona and J.C. Lacal. Activation of STAT3 is involved in Rho A oncogenic transfor (2001)

Palabras Clave

GTPasas Ras y Rho, Antitumorales, Factores de transcripción

Papel de las rutas de señalización intracelular en la resistencia a quimioterápicos

Investigador principal	Perona Abellon, Rosario, Científico Titular
Becarios Postdoctorales	Sánchez Pérez, M ^a Isabel Fresno Vara, Juan Angel(2000)
Becarios Predoctorales	Martínez Gomariz, Montserrat

Lineas de Investigación

Mecanismos de muerte celular y resistencia inducidos por quimioterápicos

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

Rutas de transducción de señales activadas por cisplatino relacionadas con apoptosis

En primer lugar hemos estudiado la activación de quinasas intracelulares de la familia MAP quinasa entre las cuales se encuentran las quinasas reguladas por agentes externos (ERK) y las quinasas reguladas por estrés (JNK y p38). Estas enzimas pueden ser activadas en respuesta a diversas señales tanto de naturaleza mitogénica como de estrés celular. Mientras que, tras la exposición a cisplatino, la quinasa de c-jun (JNK) se activa de forma rápida y transitoria, la activación por

cisplatino es lenta y persistente. El efecto diferencial ejercido por cisplatino en la activación de JNK parece ser el responsable de la regulación de la muerte celular. La actividad de las MAPKs se puede regular por defosforilación en residuos críticos para su activación, y es llevada a cabo por proteínas con actividad dual específica para MAPKs, denominadas MKPs, (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase). Los genes descritos en mamíferos incluyen CL100/MKP-1, Pac 1, h-VH5, Pyst1, entre otros. Comprobamos que el pretratamiento con un compuesto inhibidor de tirosina fosfatasas el ortovanadato, prolonga el tiempo de inducción de JNK en respuesta a ambos isómeros de platino, y esto se relaciona con una disminución de la IC50 de 10 veces indicando que alguna actividad fosfatasa de residuos de tirosina esta participando en la respuesta a ambos compuestos. Hemos comprobado que la sobreexpresión de los genes CL100 y h-VH-5 es capaz de inhibir la activación de JNK y p38 por cisplatino y esto implica también un aumento en la supervivencia en respuesta a este fármaco. Por el contrario la expresión de la fosfatasa específica de ERK, Pyst-1 no tiene efecto sobre la activación de las dos quinasas ni en la inducción de muerte celular. Los resultados indican que la actividad de determinadas MAPK fosfatasas puede estar implicada en la regulación de muerte celular en respuesta a agentes quimioterápicos. Hemos encontrado que la expresión del gen CL100 con la mutación C258A es capaz de actuar como dominante negativo de la fosfatasa CL100, Las células que expresan este gen mueren a dosis 100 veces menores de cisplatino y transplatino. Estos resultados indican que las fosfatasas de MAPK son una buena diana en la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos en la terapia con cisplatino. Por otra parte el cisplatino activa también la ruta mediada por el factor de transcripción NFκB. Esta ruta activa principalmente supervivencia en las células tratadas, ya que su inhibición aumenta la sensibilidad a cisplatino. El factor de transcripción c-Jun, cuyos niveles aumentan después del tratamiento con cisplatino, inhibe la ruta del factor de transcripción NFκB. Esta inhibición contribuye a los efectos citotóxicos del cisplatino y constituye una buena estrategia para la modulación de los efectos del cisplatino como agente quimioterápico

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

Se designan como elementos supresores génicos (GSE) a aquellos fragmentos génicos de pequeño tamaño que funcionan en dirección sentido o antisentido y que producen un fenotipo seleccionable al expresarse en una célula, debido a la inactivación de la función biológica de alguna proteína normal. Ambos tipos de GSE (sentido o antisentido) se pueden obtener por fragmentación al azar del DNA del gen o complejo génico involucrado en el fenotipo deseado. El estudio de genes involucrados en sensibilidad a cisplatino lo hemos abordado mediante la

generación de una librería normalizada de expresión de elementos supresores génicos. Esta librería se ha utilizado para aislar líneas celulares resistentes a cisplatino de las cuales hemos aislado los GSEs. Hemos obtenido varias secuencias de DNA, algunas de ellas corresponden a proteínas que se unen al DNA y que posiblemente estén involucradas en mecanismos de reparación del DNA en respuesta a cisplatino. La secuenciación de alguno de estos genes ha revelado que algunos de ellos son genes involucrados en el control de ciclo celular y reconocimiento del daño en el DNA.

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

En nuestro hemos utilizando la técnica de RT-PCR para detectar en células metastásicas localizadas en ganglios pelvianos el mRNA de antígeno prostático (PSA). Para ello se ha utilizado sangre proveniente de pacientes sometidos a prostatectomía radical en los cuales se trata de determinar la subpoblación de pacientes con cancer prostático localizado que tengan presencia de mRNA de PSA en ganglios pelvianos. Esto nos indicará si este es un mejor método para detectar las metástasis cercanas con mayor eficiencia que con los métodos tradicionales de inmunohistoquímica y esto permitirá por tanto una mejor decisión terapéutica. Del total de pacientes estudiados (250), hay un 40% de los pacientes, en los cuales no se detecta expresión de PSA por inmunocitoquímica, pero presentan células prostáticas en los ganglios, cuando se realiza la determinación de PSA por RT-PCR. El seguimiento de los pacientes nos indicará, si esta técnica es una mejor alternativa para el estadiaje de los pacientes.

Publicaciones

Sánchez, M.I., Martínez, M., Keyse, SM , Perona, R. (2000). Expression of CL100 and h-VH5 MAPK-phosphatases attenuates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*. 19 5142-5152.

Aznar, S., López Collado, E., Del Rincón, Lucas, L., Fernández-Pérez, L., PeronaR and Lacal, JC (2001). Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in rho A GTPase oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell*. 12 3282-3294.

Financiación

Cáncer de próstata: Análisis de rutas de hormonorresistencia y evaluación de métodos de detección precoz de metástasis (00/0862) financiado por FIS. Años 2000-2003

Caracterización y estudio del mecanismo de acción de genes con actividad sensibilizante o inductora de resistencia a quimioterápicos en líneas tumorales humanas.. (01/1094) financiado por FIS. Años 2001-2003

Diseño de un microchip de cDNA para la detección de resistencia a la quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón. (FIT-010000-2001-96) financiado por MCyT. Años 2001-2003

Patentes

Uso de la Proteína JNK para el control de células tumorales resistentes a cisplatino
200000815

Palabras Clave

cisplatino, resistencia, JNK, apoptosis, prostate cancer, PSA, NFkB, DNA repair

Grupo de genética molecular del cáncer

Investigador principal	Pestaña Vargas, Angel, Investigador Científico
Investigadores	Alonso García la Rosa, Francisco Javier Investigador contratado
Contratados	programa Cajal (desde febrero 2002)
Investigadores	Leone Campo, Paola F. Medicina, PUCE (Ecuador)
Visitantes	Menéndez Alejo, Ibis Mercedes Inst. Nac. Oncol. Radiobiol. (Cuba) Fraile Salamanca, Elena Inst. Nac. Cáncer (Colombia)
Becarios Predoctorales	Carrillo García, Jaime Becario FPI (desde agosto 2001) Mendiola Sabio, Marta Becaria FIS (desde junio 2000) López Gerena, Andrés Felipe Becario FGUAM (desde junio 2001)
Personal de Apoyo	Nebreda González, Paloma Ayudante contratada, FGUAM (desde 1984)
Estudiantes de Licenciatura	Moreno de B. Halcón, Carlos Estudiante BQEX (desde 2000 hasta 2001)
Colaboraciones	Dra García-Miguel, Jefa de Unidad Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital La Paz, (desde 1992) Dr Abelairas, Oftalmología Pediátrica, Hospital La Paz, Madrid

Lineas de Investigación

Caracterización del perfil de expresión génica múltiple de la oncoproteína de fusión EWS/FLI-1

(F.J. Alonso, M. Mendiola, J. Carrillo)

Mediante arrays de ADN y SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) en dos modelos celulares: i) expresión ectópica estable del gen de fusión EWS/FLI-1 en células 293 y HeLa; ii) inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 en células tumorales A673 mediante expresión estable de cDNA antisentido. Ambos modelos están en fase avanzada de caracterización y esperamos publicar un avance de resultados en los próximos meses. A partir de la experiencia adquirida en estos modelos celulares, esta línea de trabajo se desarrollará en el futuro próximo en las siguientes direcciones:

a) Desarrollo de un sistema de expresión controlada para estudiar los efectos tempranos de la expresión de la oncoproteína de fusión.

b) Estudio la expresión de receptores y factores de crecimiento vascular en tumores de Ewing y otros tipos tumorales de cara a establecer la posible existencia de circuitos autocrinos mediados por VEGFs y su control por el receptor tipò 1 y su dominio extracelular soluble.

c) Como complemento del abordaje genómico, nos proponemos identificar las proteínas reguladas por la oncoproteína quimérica EWS/FLI1 tanto en los modelos celulares como en los tumores de Ewing, de los que poseemos una colección amplia y bien documentada desde el punto de vista clínico-patológico

2) Diagnóstico molecular especializado de retinoblastoma y tumores de la familia Ewing.

(F.J. Alonso, A.F. López, P. Leone, E. Fraile, I.M. Menéndez, P. Nebreda, C. Moreno de B.)

a) En retinoblastoma, tenemos experiencia en más de 50 casos hereditarios, que ha dado lugar a 4 publicaciones, habiendo detectado nuevos polimorfismos de un nucleótido (SNPs) y nuevas mutaciones de splicing alternativo, que estamos caracterizando. De los SNPs nos interesa su distribución entre pacientes, familiares y población control y su posible utilización para el estudio de segregación alélica, caracterización de deleciones intragénicas y asociación con la enfermedad. En ese sentido, disponemos de una ayuda de la AECI para el estudio de SNPs de RB1 en muestras de población de Ecuador. También tenemos demanda de colaboración, todavía no formalizada, con el Instituto de Oncología y Radiobiología de Cuba y el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia.

b) En tumores de Ewing, realizamos el diagnóstico molecular de la traslocación, con técnicas RT-PCR, y tenemos un proyecto en consorcio con 10 hospitales, financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria, para realizar una investigación de células tumorales circulantes en pacientes tratados con el protocolo de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica, utilizando técnicas de RT-PCR cuantitativa

Publicaciones

J Alonso, P García-Miguel, J Abelairas, A Pestaña (2000). A novel complex mutation in exon 8 of RB1 in a case of isolated bilateral retinoblastoma. Hum Mut. 15 583.

A Pestaña, S Cerdán (2000). Spanish scientific productivity and equipment in magnetic resonance from a regional and European perspective. *Scientometrics*. 49 215-231.

J. Alonso, A. Pestaña (2000). Aportación de la genética al retinoblastoma. En: *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica*. (A. Fonseca, J. Abelairas eds.). Tecnimedia Editorial S.L, Madrid, pp. 193-200.

J Alonso, M Mendiola, P García-Miguel, J Abelairas, A Pestaña (2001). A microsatelita fluorescent methodology for linkage analysis in familial retinoblastoma and deletion detection at the RB1 locus in retinoblastoma and osteosarcoma. *Diag. Mol. Pathol.* 10 9-14.

J Alonso, M Mendiola, P García-Miguel, J Abelairas, E Sarret, T Vendrell , A Navajas, A Pestaña (2000). Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients. Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Human Mutation*. 17 412-422.

I Gómez, A Cabrero, T de Miguel, MT Fernandez, S Fernandez, A Pestaña (2001). INDICYT science and technology indicators in Spain: development of an application for interactive search on the Internet. *Research Evaluation*. 10 83-88.

A Pestaña (2001). Veinticinco años de ciencia y técnica en España: institucionalización e infraestructuras. *Investigación y Ciencia*. 300 70-77.

J Alonso, M Mendiola, C Moreno, A López, P García-Miguel, J Abelairas, E Sarret , A Navajas, A Pestaña (2001). Five new polymorphisms in RB1 gene in retinoblastoma patients. *Human Mutation*. 17 u437.

Financiación

Investigación de un polimorfismo en el gen HRAD54 como posible marcador de susceptibilidad en series tumorales y población control de Ecuador y España financiado por Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica. Años 2000-2000

Estudio del perfil de expresión génica múltiple en tumores de Ewing como base para la búsqueda de nuevos marcadores y dianas terapéuticas. (*SAF 2000-0163*) financiado por Programa Nacional de Salud. Años 2000-2002

Investigación de un polimorfismo en el gen RB1 en relación a la predisposición al retinoblastoma en poblaciones de Ecuador y España financiado por Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica. Años 2001-2001

Alteraciones genómica tumorales y presencia de células tumorales circulantes en pacientes de sarcoma de Ewing tratados de acuerdo al protocolo EWING-SEOP. Un estudio multicéntrico (*FIS 01-0958*) financiado por Fondo de Investigación Sanitaria. Años 2001-2003

Patentes

Nuevos polimorfismos de una sola base (SNPs) en el gen del retinoblastoma (Rb)
ES200100347

Premios

Josep Padullés de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (2001)

Palabras Clave

Tumores de Ewing, retinoblastoma, expresión génica múltiple, arrays de ADN, SAGE

Comunicación Intercelular y Señalización en Células Normales y Tumorales

Investigador principal	Villalobo Polo, Antonio, Investigador Científico
Investigadores Visitantes	Benaïm Attias, Gustavo
Becarios Postdoctorales	Ruano Ramos, M ^a José
Becarios Predoctorales	Li , Hongbing Salas Cuevas, M ^a . Valentina Cusidó Hita, David Manuel
Personal de Apoyo	Jiménez Martínez, Amparo Oliva de las Heras, José María
Estudiantes de Licenciatura	Galán, Carmen Molina Ortiz, Patricia Martín Pelegrina, M ^a Dolores Lara Almunia, Mónica De Quirós Muratel, Pablo Bernar Álvarez Muela, Alberto
Colaboraciones	Murillo Carretero, M ^a Isabel (Universidad de Cádiz) Estrada, Carmen (Universidad de Cádiz) Benaïm, Gustavo (Universidad Central de Venezuela) Quintanilla Avila, Miguel Enrich, Carlos (Universidad de Barcelona) Rey, Juan Antonio (Hospital La Paz)

Lineas de Investigación

Fosforilación de la calmodulina por proteína-tirosina quinasas

(M.V. Salas, D.M. Cusidó-Hita, C. Galán , P. Molina , M. Lara , M.D. Martín , G. Benaïm, A. Villalobo)

Nuestros trabajos han demostrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fosforila a la calmodulina (CaM) en ausencia de Ca²⁺ y presencia de un polipéptido básico que actúa como cofactor. Esta fosforilación ocurre predominantemente en la Y99 y sólo de forma residual en la Y138. Adicionalmente, Src también fosforila a la calmodulina, aunque en este caso la fosforilación de Y138 se acerca más a los niveles de fosforilación de Y99. Con objeto de discernir el papel de las diversas especies de fosfo(Tyr)calmodulina (P-

CaM) en el proceso de activación del EGFR, hemos preparado calmodulina recombinante mutada carente de residuos fosforilables específicos. Concretamente, la CaM(Y99F) está siendo utilizada en estos estudios. Por otro lado, con objeto de determinar el papel de la P-CaM *in vivo*, estamos realizando estudios en células intactas estimuladas con EGF para la identificación de P-CaM en el citosol, asociada a membranas y en el núcleo.

Regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico por calmodulina en células intactas

(M.J. Ruano, A. Villalobo)

Nuestro grupo ha puesto en evidencia que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es regulado por calmodulina en presencia de Ca^{2+} inhibiendo la actividad tirosina quinasa del receptor. La acción del complejo Ca^{2+} /calmodulina se realiza interaccionando éste con un dominio de unión de la calmodulina (CaM-BD) localizado en la región citosólica yuxtamembranal del receptor en la que también se encuentra la T654, el sitio principal de fosforilación del receptor por proteína quinasa C (PKC). Esta fosforilación induce la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor y previene su internalización. Por el contrario, la calmodulina podría estar implicada en la internalización y tráfico intracelular del EGFR. En apoyo de este concepto, hemos puesto en evidencia en células intactas normales y tumorales que un inhibidor permeante de la calmodulina induce una fuerte disminución de la transactivación del EGFR mediado por el ligando. Este proceso ocurre incluso después de inhibir otros sistemas que podrían afectar la actividad del EGFR, incluyendo aquellos dependientes de Ca^{2+} /calmodulina, como la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMPK-II) o la fosfatasa calcineurina; o sistemas dependientes de Ca^{2+} , como la PKC. Por el contrario, en células transfectadas que expresan un EGFR mutado con una inserción en el CaM-BD que lo divide en dos partes, presenta similares niveles de transactivación en ausencia y en presencia del inhibidor de calmodulina. Estos resultados indican que la calmodulina está directamente implicada en la regulación del EGFR *in vivo*.

Papel funcional del dominio de unión de la calmodulina y el dominio similar a la calmodulina del receptor del factor de crecimiento epidérmico: Implicación en tumorigénesis

(H. Li, D.M. Cusidó-Hita, J.M. Oliva, A. Villalobo)

Hemos demostrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano expresado en células transfectadas y en células tumorales interacciona directamente con la calmodulina sin necesidad de proteínas adaptadoras que la

unan al receptor. No obstante, diversas proteínas que unen calmodulina parecen también asociarse al EGFR, incluyendo dos mayoritarias que hemos denominado p190 y p160. En trabajos previos de nuestro laboratorio, y utilizando proteínas de fusión, demostramos que la región citosólica yuxtamembranal del EGFR es la responsable de la unión de la calmodulina. Este dominio (CaM-BD) comprende los residuos 645-660 del EGFR humano y posee además la T654, sitio preferente de fosforilación por la proteína quinasa C (PKC), lo que induce la inhibición de la actividad tirosina quinasa del mismo y previene su internalización. La unión de calmodulina a la proteína de fusión (GST/CaM-BD) previene la fosforilación mediada por PKC y recíprocamente, la fosforilación previa de la GST/CaM-BD por PKC previene la unión de la calmodulina. Para explorar el papel de la T654 fosforilada en la regulación del EGFR por calmodulina, hemos preparado una GST/CaM-BD en la que la T654 se ha substituido por ácido glutámico para que mimetice de forma constitutiva la carga negativa del fosfato. De esta forma, podremos ensayar si esta mutación previene la unión de la calmodulina y poder posteriormente estudiar en células transfectadas con un EGFR portador de dicha mutación su repercusión en proliferación celular. Recientemente, se ha demostrado que el EGFR migra al núcleo y actúa directamente como un factor transcripcional de la ciclina D1. Dado que la secuencia de localización nuclear (NLS) propuesta coincide con el CaM-BD descrito por nuestro grupo, hemos iniciado un estudio sobre el papel de la calmodulina en el proceso de translocación nuclear utilizando receptores quimeras EGFR-GFP wild type y EGFR(Δ 645-660)-GFP, es decir con la delección del CaM-BD. Por otro lado, también hemos identificado en el EGFR humano un dominio muy ácido que tiene homología de secuencia con la calmodulina que hemos denominado dominio similar a la calmodulina (CaM-LD) y que comprende los residuos 979-992. En atención a sistemas similares en otras proteínas que unen calmodulina, hemos propuesto que en ausencia del ligando existe interacción intramolecular entre el CaM-BD y el CaM-LD del EGFR, actuando el CaM-LD como un dominio autoinhibidor, proceso que es liberado una vez unido el ligando. Así, estamos estudiando la interacción física del CaM-BD y CaM-LD utilizando proteínas de fusión portadoras de los mismos. Dado que mutaciones del CaM-BD y/o CaM-LD podrían resultar en la activación constitutiva del EGFR, hemos también iniciado estudios sobre las consecuencias funcionales de las mutaciones y delecciones de estos dominios y, en colaboración con un grupo hospitalario, la búsqueda sistemática de alteraciones de estos dominios en tumores humanos de origen neuronal.

Interacción de la calmodulina con otros receptores ErbB

(H. Li, A. Villalobo)

El dominio de unión de la calmodulina (CaM-BD) y el dominio similar a la calmodulina (CaM-LD) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano están muy conservados filogenéticamente y además poseen características similares en otros receptores de la familia ErbB, tales como ErbB2/Neu y ErbB4. Sin embargo, el grado de homología en el receptor ErbB3 es menor. El receptor ErbB3 no posee actividad tirosina quinasa intrínseca debido a que tiene un dominio catalítico modificado, lo que sugiere que la ausencia de un CaM-BD y/o CaM-LD conservados sólo es importante en receptores con un dominio catalítico funcional. En este contexto, hemos iniciado una investigación para determinar si, adicionalmente al EGFR, otros miembros de esta familia de receptores son capaces de interactuar con la calmodulina. Así, resultados preliminares llevados a cabo en células SK-BR3 de adenocarcinoma de mama humano indican que el receptor ErbB2/Neu también interactúa directamente con la calmodulina.

Interacción de la calmodulina con la proteína adaptadora Grb7

(H. Li, A. Villalobo)

Con objeto de identificar mecanismos adicionales de acción de la calmodulina sobre la proliferación celular mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor ErbB2/Neu, hemos iniciado una búsqueda de proteínas implicadas en la señalización mediada por estos receptores que directa o indirectamente interactúan con la calmodulina. Así, hemos demostrado en células SK-BR3 de adenocarcinoma de mama humano que la proteína adaptadora Grb7, implicada en la señalización mediada por el EGFR y por ErbB2/Neu, interactúa con la calmodulina. Estos estudios se han realizado mediante el aislamiento de Grb7 por cromatografía de afinidad usando calmodulina inmovilizada. Por otro lado, hemos identificado en la proteína Grb7 humana un segmento anfifílico básico que forma un α -hélice en su secuencia aminoacídica cuyas características concuerdan con las de un sitio de unión de la calmodulina (CaM-BD) y que comprende los residuos 243-256.

Regulación de la proliferación celular por óxido nítrico

(M.J. Ruano, M.I. Murillo, A. Álvarez-Muela, P.B. De Quirós, C. Estrada, A. Villalobo)

Nuestro grupo ha demostrado que el óxido nítrico inhibe la proliferación celular de una forma independiente de cGMP e induce la S-nitrosilación reversible del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibiendo la actividad tirosina quinasa intrínseca de éste. Los primeros trabajos sobre el EGFR, se realizaron en células permeabilizadas usando fibroblastos EGFR-T17

transfectados que sobreexpresan el receptor humano. Más recientemente, hemos estudiado este proceso en células intactas utilizando fibroblastos EGFR-T17, células A431 de carcinoma epidermoide humano y células NB69 de neuroblastoma humano. Además, en estas últimas, hemos puesto en evidencia que la inhibición de la óxido nítrico sintetasa endógena induce un ligero pero significativo aumento de la proliferación celular, lo que sugiere que el óxido nítrico tiene un papel funcional fisiológico regulando la mitogénesis. Adicionalmente, hemos demostrado que el óxido nítrico induce en células tumorales A431 la fosforilación en residuos de tirosina de una proteína de 58 kDa que hemos denominado NOIPP-58 (por Nitric Oxide-Induced 58 kDa Phospho-Protein). La fosforilación de la NOIPP-58 es estrictamente dependiente de EGF, se revierte rápidamente cuando se elimina el óxido nítrico del medio y se previene por inhibidores de las p38MAPKs, pero no por inhibidores de ERK1/2. Por otro lado, el óxido nítrico induce la activación de la vía de la p38MAPK tanto en ausencia como en presencia de EGF. Asimismo, hemos demostrado la existencia de una fosfoproteína-tirosina fosfatasa que es inactiva cuando la vía de la p38MAPK se activa. Esta fosfatasa desfosforila tanto al EGFR como a la NOIPP-58 cuando se inhibe la vía de la p38MAPK, contribuyendo así a la inactivación de sus señalizaciones. El papel funcional de la NOIPP-58 continua en estudio.

Activación de proteína-tirosina quinasas en células transfectadas con la glicoproteína PA2.26

(M. Quintanilla, A. Jiménez, A. Villalobo)

PA2.26 es una glicoproteína del tipo de las mucinas localizada en la superficie celular de queratinocitos que se expresa en estadios progresivos del proceso carcinogénico. Esta glicoproteína está implicada en el incremento de la movilidad celular induciendo un aumento de las proyecciones de la membrana plasmática y una disminución de la adhesión celular, jugando por tanto un papel relevante en la progresión maligna de tumores epidérmicos. Utilizando células transfectadas con PA2.26 hemos iniciado un estudio sobre la posible participación de proteína-tirosina quinasas en estos procesos. Así, hemos puesto en evidencia que las células transfectadas con PA2.26 muestran una masiva hiperfosforilación en residuos de tirosina de múltiples proteínas comparada con células control no transfectadas. Adicionalmente, experimentos preliminares indican que ni el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ni quinasas de la familia Src, son responsables de este fenómeno. La identificación de la(s) proteína-tirosina quinasa(s) implicadas y sus vías de señalización están en estudio.

Publicaciones

Hernández-Hernando, S., Ruano, M.J., Estrada, C., Villalobo, A. (2000). Inhibition of the epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase and EGF-dependent phosphorylation of a 58 kDa protein in intact A431 tumor cells induced by nitric oxide. En: The biology of nitric oxide. (Moncada, S., Gustafsson, L., Wiklund, P., and Higgs, E. A. eds.). Portland Press, London, Part 7 p. 134.

Villalobo, A. (2000). Cellular signaling: A short overview of a complex problem (Editorial). *Electr. J. Pathol. Histol.* 6.1 001-02.HTM.

Li, H., Palomo-Jiménez, P.I., Ruano, M.J., Villalobo, A. (2000). Signal transduction and regulation of the epidermal growth factor receptor (invited Review). *Electr. J. Pathol. Histol.* 6.1 001-07.HTM.

Villalobo, A., Ruano, M.J., Palomo-Jiménez, P.I., Li, H., Martín-Nieto, J. (2000). The epidermal growth factor receptor and the calcium signal. En: *The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine*. Kluwer Academic Publishers, Boston MA, pp. 287-303.

Palomo-Jiménez, P.I., Ruano, M.J., Villalobo, A. (2000). El receptor del factor de crecimiento epidérmico (invited Review). *Vitae*. 5
<http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeCinco/>.

García-Nieto, R.M., San José, E., Martín-Nieto, J., Villalobo, A. (2001). Characterization of a new plasma membrane-associated ecto 5'-phosphodiesterase/nucleotide-pyrophosphatase from rat hepatocarcinoma AS-30D cells. *J. Physiol. Biochem.* 57 31-40.

Lipton, A., Villalobo, A. (2001). EGFR-targeted cancer research: continuing progress and changing views (Editorial). *Signal*. 2 2-3.

Villalobo, A. (2001). Lectins and cellular signaling (invited Review). *Electr. J. Pathol. Histol.* 7.1 011-03.

Villalobo, A., Cusidó-Hita, D.M., Ruano, M.J. (2001). Glycobiological strategies to inhibit the proliferative potential of ErbB receptors in human cancer (invited Review). *Electr. J. Pathol. Histol.* 7.4 014-04.

Financiación

Alteraciones de la regulación del receptor del EGF mediado por calmodulina en células tumorales (Investigador Principal: A. Villalobo) (*SAF99-0052*) financiado por Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I + D). Años 1999-2002

Regulación de la proliferación celular por calmodulina/fosfocalmodulina (Investigador Principal: A. Villalobo) (*99CN0011*) financiado por Agencia Española de Cooperación Internacional. Años 1999-2001

Regulación de la Ca^{2+} -ATPasa de humanos y tripanosomatídios por el receptor del factor de crecimiento epidérmico y la fosfocalmodulina (Investigadores Principales: A. Villalobo & G. Benaim) (*Programa de Cooperación con Iberoamérica*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura, Subdirección General de Cooperación Internacional. Años 1998-2000

La señal del Ca^{2+} generada por el homólogo del receptor del factor de crecimiento epidérmico de trypanosomatídeos (Investigadores Principales: A. Villalobo & G. Benaim) (*Programa de Cooperación con Iberoamérica*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura, Subdirección General de Cooperación Internacional. Años 2001-2002

Microscopio confocal para análisis de muestras fijadas e in vivo (Investigadores Responsables: F. Clascá & 19 otros) financiado por Comunidad Europea. Fondos FEDER (Infraestructura). Años 2001-2001

Palabras Clave

Calmodulina, EGFR, fosfo(Tyr)calmodulina, Grb7, NOIPP-58, óxido nítrico, p38MAPK, Src

**Departamento de Bioquímica y
Genética de Levaduras**

Estructura y función de transportadores ABC

Investigador principal	Eraso Mazmela, Pilar, Profesor Titular UAM
Investigadores Asociados	Mazón Calpena, María Jesús Portillo Pérez, Francisco
Colaboraciones	Thorner, Jeremy. Universidad de California, Berkeley, USA.

Lineas de Investigación

Interacciones funcionales y estructurales entre distintos dominios de Ycf1 (Yeast Cadmium Factor)

(J.M. Falcón, M. Martínez-Burgos, M.J. Mazón, P. Eraso)

Ycf1 es un transportador ABC de *S.cerevisiae* que confiere resistencia a Cd^{2+} y a otros metales y compuestos tóxicos transportándolos al interior de la vacuola en forma de complejos o conjugados con glutation. En un análisis de supresión intragénica para detectar interacciones funcionales y estructurales entre dominios de la proteína se aislaron una serie de supresores de las mutaciones D777N, localizada en uno de los dominios de unión a nucleótido, y S908A, en el dominio regulador. Con objeto de estudiar en mayor profundidad el mecanismo de supresión se han caracterizado los mutantes portadores de las mutaciones supresoras separadas de las mutaciones primarias. En el caso de los mutantes supresores de D777N, el análisis del fenotipo de resistencia a distintos compuestos permite incluirlos en dos grupos. Uno incluye mutantes que tienen muy disminuida su capacidad de resistencia a diversos tóxicos (A1021T, A1021V, G1207D, S1212L y R1415G) indicando que los residuos afectados son importantes para la funcionalidad de la proteína. El segundo grupo incluye mutantes con una clara alteración del perfil de resistencia (V543I, F565L, Q1107R, G1207S y W1225C) indicando que dichos residuos están implicados en la determinación de la especificidad de sustrato. El hecho de que el defecto producido por la mutación D777N, en el sitio de unión de ATP, pueda ser suprimido por mutaciones que afectan al sitio de unión del sustrato indica que el Asp777 podría estar implicado de forma directa en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a la unión y/o translocación del sustrato necesario para la función de la proteína. En el caso de los supresores de S908A, se han estudiado las cepas portadoras de las mutaciones D213G, M230V, M226V y N210D, localizadas en el extremo NH₂-terminal de la proteína. En todos los casos se ha encontrado un

aumento de 5-8 veces en la cantidad de Ycf1 en la membrana vacuolar lo que sugiere la importancia de dicha región en la estabilidad de la proteína.

Mecanismos moleculares implicados en la especificidad de sustrato de Ste6

(P. Eraso, J. Thorner)

La proteína Ste6 es un transportador ABC de *S.cerevisiae* responsable de la secreción al medio extracelular del factor-a, necesario para la fusión de células haploides en dicho organismo. Ste6 es altamente específica para su sustrato, el factor-a. Este es un péptido de 12 aminoácidos con la cisteína C-terminal isoprenilada y carboximetilada. Nos proponemos llevar a cabo un estudio de los determinantes estructurales del factor-a esenciales para el reconocimiento y transporte mediado por Ste6. Para ello se analizará la capacidad de diversos análogos del factor-a para competir con el sustrato nativo en ensayos de transporte. Para llevar a cabo este estudio es necesario en primer lugar disponer de un buen ensayo *in vitro* de la actividad transportadora de Ste6. La expresión de esta proteína es baja y además es rápidamente endocitada y degradada después de ser transportada a la membrana plasmática. Por ello hemos expresado Ste6 bajo el control de un promotor fuerte inducible a 37 °C en un mutante *sec6^{ts}* de la vía de secreción defectivo en el último paso de fusión de vesículas a la membrana plasmática. En este mutante a la temperatura de inducción de la expresión se acumulan las vesículas de secreción portadoras de proteínas en tránsito a la membrana plasmática. Utilizando este sistema hemos conseguido un alto nivel de expresión de Ste6. Además hemos puesto a punto el ensayo de transporte del factor-a dependiente de Ste6 en dichas vesículas utilizando [³⁵S] factor-a. El factor-a marcado radiactivamente no es comercial por lo que ha sido necesaria previamente la optimización de las condiciones de marcaje *in vivo* y purificación.

Publicaciones

Falcón, J.M., Martínez-Burgos, M., Molano, J., Mazón, M.J., Eraso, P. (2001). Domain interactions in the yeast ATP binding cassette transporter Ycf1p: intragenic suppressor analysis of mutations in the nucleotide binding domains. J.Bacteriol. 183 4761-4770.

Financiación

Análisis de dominios funcionales de la proteína CFTR y de su interacción. Efecto de mutaciones de fibrosis quística y de sus mutaciones supresoras (98/1279) financiado por Fondo de Investigación Sanitaria. Años 1998-2000

Aislamiento y caracterización de genes implicados en la activación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura (*PB97-0054*) financiado por Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Años 1998-2001

Palabras Clave

levadura, transportador ABC, estructura-función, interacción entre dominios, especificidad de sustrato

Genes que afectan el flujo glicolítico en distintas levaduras

Investigador principal	Gancedo Rodríguez, Carlos, Profesor de Investigación
Investigadores	Nedeva , Trayana(desde octubre 2000 hasta junio 2001)
Visitantes	
Becarios	Flores Mauriz, Carmen Lisset
Postdoctorales	
Becarios Predoctorales	Rodríguez Iglesias, Cristina(hasta junio 2000)
Personal de Apoyo	Bermúdez de Castro Risueño, María Isabel
Colaboraciones	François, J.M. (Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, INSA, Toulouse, Francia) Goday, C. (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) van Dam, K. (Swammerdam Institute for Life Sciences, Amsterdam, Países Bajos)

Lineas de Investigación

Regulación del flujo glicolítico en levaduras y su relación con la represión catabólica

(C.L. Flores, T. Petit, C. Rodríguez, O. Zaragoza)

Hemos mostrado que la expresión de genes que codifican transportadores de hexosas se encuentra alterada en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* afectados en la actividad de la hexokinasa 2. La expresión de genes codificantes de hexokinasa heterólogas corrige el defecto de los mutantes de *S. cerevisiae*. Se han aislado mutantes resistentes a la represión catabólica por galactosa. Estos mutantes tienen alterado o bien el transporte del azúcar o la función de un activador que controla la transcripción de los genes GAL. Asimismo hemos aislado mutantes que son resistentes simultáneamente a la acción represora de la glucosa y de la galactosa. El estudio del gen MIG1 en *Candida albicans* ha mostrado que a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae* el producto de este gen no participa en la represión catabólica en esta especie. Está en marcha el estudio de un gen de *Yarrowia lipolytica* que corrige el fenotipo de mutantes *tps1* de *S. cerevisiae* que presentan una desregulación de la glicolisis. La secuencia de este gen tiene homología con la de un gen de *S. cerevisiae* de función desconocida.

Publicaciones

Zaragoza, O., Rodríguez, C., Gancedo, C. (2000). Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J. Bacteriol.* 182 320-326.

Jiménez, M., Petit, T., Gancedo, C., Goday, C. (2000). The *alm1+* gene from *Schizosaccharomyces pombe* encodes a coiled-coil protein that associates with the medial region during mitosis. *Mol. Gen. Genet.* 262 921-930.

Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J.C., Gancedo, J.M. (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35 161-172.

Rodríguez, C., Flores, C.L. (2000). Mutations in GAL2 or GAL4 alleviate catabolite repression produced by galactose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Mic. Technology.* 26 748-755.

Flores, C.L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Mic. Reviews.* 24 507-529.

Huet, C., Menéndez, J., Gancedo, C., François, J.M. (2000). Regulation of PYC1 encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 267 6817-6823.

Petit, T., Diderich, J.A., Kruckeberg, A.L., Gancedo, C., van Dam, K. (2000). Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182 6815-6818.

Tesis Doctoral

Cristina Rodríguez Iglesias

"Comparación de los efectos de la glucosa y la galactosa en *Saccharomyces cerevisiae* y búsqueda de supresores extragénicos de mutaciones en los genes codificantes de la piruvato carboxilasa". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Carlos Gancedo. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Traslocación de transportadores de azúcares y transmisión de la señal de la glucosa en levadura (*PB97-1213-CO2-01*) financiado por Dirección General de Enseñanza superior e Investigación científica. Años 1998-2001

Palabras Clave

levadura, *Yarrowia*, *Candida*, trehalosa

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

Investigador principal	Lagunas Gil, Rosario, Profesor de Investigación
Becarios Predoctorales	Lucero Perdones, M ^a Pilar Peñalver Rodriguez, Élida
Personal de Apoyo	Moreno Egido, Eulalia
Estudiantes de Licenciatura	Vela González del Peral, Laura

Lineas de Investigación

Papel de la ubiquitina en la señalización de la endocitosis del transportador de maltosa en levadura.

(P. Lucero, E. Peñalver, L. Vela, R. Lagunas)

En un trabajo previo obtuvimos evidencia de que la internalización del transportador de maltosa en levadura, una proteína con 12 segmentos transmembrana, requiere la unión de ubiquitina (Ub). Basados en este hecho, hemos investigado si la internalización de dicho transportador requiere la unión de cadenas de Ub, o si por el contrario, la unión de una sola molécula de Ub es suficiente para desencadenar el proceso. Para ello hemos sobreexpresado moléculas de Ub con distintas mutaciones que impiden la formación de los distintos tipos de cadenas en una cepa mutante de levadura que carece de Ub libre. Los resultados han mostrado que la unión de una sola molécula de Ub es suficiente para desencadenar la máxima velocidad de internalización del transportador. Este resultado muestra que, en contra de lo que se ha postulado, la internalización en levadura de proteínas con 12 segmentos transmembrana no requiere la formación de cadenas de Ub.

La inactivación de los transportadores de azúcares y su papel en la utilización preferencial de la glucosa en levadura.

(P. Lucero, E. Moreno y R. Lagunas)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza glucosa con preferencia a cualquier otra fuente de energía y se acepta que la inactivación de los transportadores de azúcares distintos a los de glucosa es uno de los mecanismos que, de forma específica, favorecen este uso preferencial. Sin embargo, resultados previos de

nuestro laboratorio han sugerido que la inactivación de los transportadores a los que se atribuye el fenómeno podría no ser un mecanismo específico de regulación como se viene suponiendo, sino simplemente consecuencia de un aumento inespecífico de la degradación de proteínas. Es importante hacer notar que estos estudios se realizan en medios carentes de fuente de nitrógeno y es bien sabido que la carencia de este nutriente desencadena un rápido recambio de proteínas en levadura. Hemos investigado esta posibilidad y los resultados obtenidos muestran que, efectivamente, la inactivación de los transportadores de azúcares distintos de los de la glucosa no es un mecanismo específico de control y, además, que esta inactivación no contribuye de forma significativa al uso preferencial de la glucosa por este organismo.

Publicaciones

Lucero, P., E. Peñalver, L. Vela & R. Lagunas (2000). Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. . *J. Bacteriol.* 182 241-243.

Lucero, P., E. Peñalver, E. Moreno & R. Lagunas (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. . *Appl. Environ. Microbiol.* 66 4456-4461.

Lucero, P., E. Moreno & R. Lagunas (2001). Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source. *FEMS Yeast Res.* 1 307-314.

Tesis Doctoral

Peñalver Rodríguez, Élida

"Factores que controlan la endocitosis del transportador del maltosa en *Saccharomyces cerevisiae*". Universidad de Alcalá de Henares. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Rosario Lagunas. Calificación: Apto "cum laude".

Lucero Perdonés, Pilar

"Mecanismos de degradación del transportador de maltosa en *Saccharomyces cerevisiae*". Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. 2000. Director: Rosario Lagunas. Calificación: Apto "cum laude".

Palabras Clave

Endocitosis, recambio de proteínas de membrana, inactivación de transportadores

Análisis funcional de genes de levadura

Investigador principal	Mazón Calpena, María Jesús, Investigador Científico
Investigadores	Eraso Mazmela, Pilar
Asociados	Portillo Pérez, Francisco
Becarios	Gaigg , Bárbara(desde 2001 hasta mayo 2002)
Postdoctorales	Leber , Regina(desde diciembre 1999 hasta marzo 2001)
Becarios Predoctorales	Silles Mclaney, Eduardo
Personal de Apoyo	Morgado Galeano, Eulalia
Estudiantes de Licenciatura	Martínez Burgos, Mónica(desde octubre 1999 hasta 2000)
Colaboraciones	Sandoval, Ignacio, Profesor de Investigación, CBM Molina, María, Profesora Titular, Dpto. Microbiología II, Fac. Farmacia, UCM (desde octubre 2000) Ruiz, Cristina, Becaria predoctoral, Dpto. Microbiología II, Fac. Farmacia, UCM (desde octubre 2000)

Lineas de Investigación

Mecanismos de transporte de la Aminopeptidasa I a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae*.

(B. Gaigg, R. Leber, E. Silles I.Sandoval , M.J. Mazón)

La Aminopeptidasa I (API) es una hidrolasa residente en la vacuola de *S.cerevisiae*, que es transportada a esta organela por una ruta distinta de la ruta secretora clásica. API no tiene señal de entrada al retículo endoplásmico y su transporte a la vacuola no es inhibido cuando se bloquea la ruta secretora. El análisis genético de la ruta de transporte de API a la vacuola ha revelado que muchos de los genes implicados son también elementos de la ruta autofágica, es decir, que existe un solapamiento entre una ruta biosintética y constitutiva (ruta CVT) y una ruta inducible, de degradación general, como es la autofagia (ruta APG), que se desencadena en situaciones de ayuno de nutrientes. API se sintetiza como una forma precursora con una extensión de 45 residuos (prepro péptido) en el extremo amino, que son eliminados mediante proteólisis, durante el importe a la vacuola. Nosotros estamos interesados en analizar los mecanismos de transporte de API e identificar nuevas proteínas implicadas. Para ello, buscamos proteínas capaces de interaccionar con el prepro péptido in vitro, potencialmente implicadas

en el proceso de transporte, y detectamos que las chaperonas Ssa1/Ssa2 son necesarias para el transporte de API, de modo que, en ausencia de una chaperona activa, API permanece en el citoplasma en su forma precursora. Actualmente estamos estudiando una proteína, Yol082/Cvt19, detectada utilizando el ensayo de 2-híbridos llevando como cebo la proteína API. Cvt19 es necesaria para el transporte de API a la vacuola tanto en condiciones de crecimiento como de ayuno de nutrientes. Nuestros datos indican que Cvt19 actúa como un receptor de API necesario para su inclusión en las vesículas transportadoras. Para obtener información sobre el mecanismo de acción de Cvt19 en el transporte de API a la vacuola estamos buscando proteínas que interaccionen con Cvt19 mediante experimentos de inmunoprecipitación y de 2-híbridos

Análisis funcional del gen ITC1 que codifica la subunidad reguladora de un complejo remodelador de cromatina

(Ruiz, C., E. Morgado M. Molina, M.J. Mazón)

Durante el proyecto de interrupción sistemática de genes de *Saccharomyces cerevisiae*, el estudio del fenotipo de un mutante en el gen ITC1 reveló que tiene disminuida su capacidad de cruzamiento y que presenta una morfología aberrante similar a la que muestran las células que están expuestas a feromona. Este fenotipo es exclusivo de células MAT α itc1, siendo las MAT α itc1 normales tanto morfológicamente como en el cruzamiento. Para analizar el fenotipo morfológico y de cruzamiento de este mutante, estudiamos el estado de activación de la ruta de señalización que se activa por feromonas, utilizando como gen testigo una fusión FUS1-lacZ, un gen marcador de conjugación, y encontramos que esta fusión está constitutivamente activa en células MAT α itc1. Nuestros datos mostraron también que, en este mutante, las MAP quinasas efectoras de la ruta están constitutivamente activas y que es necesario que la ruta esté intacta para que se manifieste el fenotipo. Posteriormente, el grupo de Tsukiyama demostró que el producto génico del gen ITC1 forma, junto con la proteína Isw2, un complejo remodelador de cromatina que reprime la expresión de genes específicos de meiosis durante el crecimiento mitótico, a través del factor transcripción Ume6p. Mediante análisis de PCR semicuantitativa hemos demostrado que el mutante haploide itc1 α y el mutante diploide itc1/itc1 homocigoto, tienen desreprimidos los genes α -específicos, al contrario de lo que ocurre en una cepa silvestre. Este resultado sugiere que, en ausencia de la subunidad Itc1, el complejo Itc1/Isw2 no puede ser reclutado para reprimir los genes α -específicos. Nos proponemos estudiar cuál o cuáles son los factores que reclutan este complejo remodelador a los genes α -específicos en una cepa silvestre

Estudio estructura-función de transportadores ABC: modificación postraducciona del factor de resistencia a cadmio Ycf1

(M. Martínez-Burgos, P. Eraso, M.J. Mazón, Ver resumen de Pilar Eraso)

El factor de resistencia a cadmio Ycf1 es un transportador perteneciente a la familia de transportadores ABC y se localiza en la membrana vacuolar de la levadura. Ycf1 contiene un sitio putativo de fosforilación en el dominio regulador. Hemos introducido mutaciones en la serina potencialmente fosforilable de este sitio mediante mutagénesis dirigida. El mutante Ser908/Ala tiene muy afectada su capacidad de detoxificar cadmio, con un MIC (concentración mínima inhibidora) de 265 micromolar frente a 800 micromolar de la cepa silvestre. El estudio de la capacidad transportadora de estos mutantes, en vesículas de membranas vacuolares, ha revelado que el cambio Ser/Ala disminuye la velocidad máxima, mientras que los cambios Ser/Asp y Ser/Glu recuperan una v_{max} cercana a la de la proteína silvestre y lo mismo ocurre con su capacidad de detoxificar cadmio. El cambio Ser/Thr, obtenido entre los supresores intragénicos de la mutación Ser908/Ala, muestra una v_{max} y una capacidad detoxificadora in vivo próxima a la del transportador silvestre. Estos datos sugieren fuertemente que el residuo Ser908 está fosforilado y que su fosforilación es necesaria para la función de la proteína. Ninguno de los mutantes mencionados tiene afectada su afinidad por ATP. Ycf1 se localiza correctamente en la vacuola en los cuatro mutantes, pero su movilidad en geles de poliacrilamida-SDS está alterada, produciéndose una doble banda que no se observa en la proteína silvestre. La contribución de las dos formas de Ycf1 que constituyen el doblete se modifica cuando se preparan las membranas en presencia de inhibidores de fosfatasa. Los datos obtenidos hasta ahora son compatibles con la existencia de un segundo sitio de fosforilación en Ycf1, cuya fosforilación se ve afectada por la introducción de un cambio en la serina 908.

Publicaciones

Falcón, J.M., Martínez-Burgos, M. Molano, J., Mazón, M.J., Eraso, P. (2001). Domain interactions in the yeast ATP binding cassette transporter Ycf1p: intragenic suppressor analysis of mutations in the nucleotide binding domains. *J.Bacteriol.* 183 4761-4770.

Leber, R., Silles, E. Sandoval, I.V., Mazón, M.J. (2001). Yol082p, a Novel CVT Protein Involved in the Selective Targeting of Aminopeptidase I to the Yeast Vacuole. *J.Biol.Chem.* 276 29210-29217.

Silles, E., Mazón, M.J., Gevaert, K., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Leber, R. Sandoval, I.V. (2000). Targeting of Aminopeptidase I to the yeast vacuole is

mediated by Ssa1p, a cytosolic member of the 70-kDa stress protein family .
J.Biol.Chem. 275 34054-34059 .

Escribano, M.V., Mazón, M.J. (2000). Disruption of six novel ORFs from
Saccharomyces cerevisiae chromosome VII and phenotypic analysis of the
deletants . Yeast. 16 621-630.

Financiación

Aislamiento y caracterización de genes implicados en la activación de la H-
ATPasa de la membrana plasmática de levadura (*PB97-0054*) financiado por
Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Años 1998-
2001

Sorting of endosomal and lysosomal proteins by molecular machineries (*FMRX-
CT96-0058*) financiado por UE. Años 1997-2002

Análisis de dominios funcionales de la proteína CFTR y de su interacción. Efecto
de mutaciones de fibrosis quística y de sus mutaciones supresoras (*98/1279*)
financiado por Fondo de Investigaciones Sanitarias. Años 1998-2000

Palabras Clave

transporte vesicular, vacuola, distribución intracelular, señalización feromonas,
regulación transcripcional, remodelación cromatina, estructura-función,
fosforilación, mutagénesis

Estructura, regulación y biogénesis de una bomba iónica eucariota.

Investigador principal	Portillo Pérez, Francisco, Profesor Titular UAM
Investigadores	Eraso Mazmela, Pilar
Asociados	Mazón Calpena, María Jesús
Becarios Predoctorales	Fuente de los Llanos, Natalia de la(hasta enero 2000)
Colaboraciones	Cano García, Amparo Angela M. Nieto (Instituto Cajal, Madrid) Randy Schekman (UC Berkeley, U.S.A) Ramón Serrano (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia)

Lineas de Investigación

Dominio de Pma1 implicado en la degradación de alelos mutantes.

(F. Portillo)

La H⁺-ATPasa de levadura (Pma1) es un enzima esencial para la vida de dicho organismo. Pma1 utiliza la vía secretora para alcanzar la membrana plasmática. A lo largo de esta vía existen, al menos, tres mecanismos implicados en la degradación de aquellas Pma1 mutantes que presenten un plegamiento anómalo. Todos estos mecanismos de control de calidad presentan la característica común de que requieren la ubiquitinación de la proteína mutante para poder degradarla. La ubiquitinación de las formas mutantes es mediada por una ubiquitina-ligasa denominada Rsp5.

Mediante un análisis de supresión intragénica de mutantes *pma1* afectados en el plegamiento hemos encontrado un dominio en Pma1 que suprime la ubiquitinación y degradación de dichos enzimas mutantes. Resultados preliminares sugieren que dicho dominio es el sitio de unión de la ubiquitina-ligasa Rsp5.

Proteínas quinasas implicadas en la regulación de Pma1.

(F. Portillo, R. Serrano)

La glucosa ejerce un control transcripcional y post-transcripcional sobre Pma1. A nivel post-transcripcional, la glucosa induce una activación de la H⁺-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. El extremo carboxilo terminal del enzima actúa en esta regulación como un dominio inhibidor, que interacciona con el sitio de unión a ATP y el sitio de transporte de protones para inhibir la actividad. Resultados obtenidos posteriormente con otras P-ATPasas sugieren que este es un mecanismo universal de regulación de las ATPasas eucariotas. En levaduras, la adición de glucosa da lugar a la pérdida de la interacción inhibidora lo cual parece mediado por fosforilación del extremo carboxilo terminal del enzima. En el extremo carboxilo terminal de Pma1 hay dos aminoácidos (Ser-899 y Thr-912) susceptibles de ser fosforilados. Mutaciones en la Ser-899 afectan al cambio de K_M que tiene lugar durante la activación, y, mutaciones en la Thr-912 afectan al cambio de V_{max} .

Se ha llevado a cabo un análisis sistemático del fenotipo de mutantes en cada uno de los genes de levadura que codifican proteínas quinasas. Este análisis nos ha permitido identificar una proteína quinasa (Ptk2) implicada en la activación de Pma1. Mutantes *ptk2* Δ son defectivos en el cambio de K_M que tiene lugar durante la activación, lo cual sugiere que Ptk2 es la proteína quinasa implicada en la fosforilación de la Ser-899.

Proteínas quinasas implicadas en la biogénesis de Pma1

(F. Portillo, R. Schekman)

Pma1 es una de las proteína mas abundantes que utiliza la vía secretora para su localización final. El transporte de Pma1 entre el retículo endoplasmático (RE) y el Golgi esta mediado por vesículas COPII. El transporte mediado por vesículas COPII es un mecanismo universal en eucariotas. La formación de vesículas COPII es regulada por Sar1, una proteína G de pequeño tamaño molecular. Sar1 recluta dos complejos, Sec23/Sec24 y Sec13/Sec31. Sec23/Sec24 esta implicado en la entrada selectiva de las proteínas cargo a la vesícula y Sec13/Sec31 es necesario para estabilizar las vesículas. Sec31 es una fosfoproteína y su fosforilación es esencial para la actividad.

El análisis sistemático de proteínas quinasas mencionado mas arriba nos permitió identificar una proteína quinasa (Kas1) implicada en la biogénesis de Pma1. Mutantes *kas1* Δ presentan un defecto en el transporte de Pma1 entre el RE y el Golgi debido a que Sec31 no esta fosforilado. Esto resultados sugieren que Kas 1 esta implicada en la fosforilación de Sec31.

Aislamiento de factores de transcripción implicados en la expresión de caderina E

(F. Portillo, A. Cano, A.M. Nieto)

La caderina E es una molécula implicada en la adhesión celular. Las interacciones intercelulares mediada por caderina E son de gran importancia para el mantenimiento de la arquitectura del tejido epitelial tanto en el embrión como en el organismo adulto. Por otra parte, el silenciamiento de la expresión de caderina E es un hecho determinante en la adquisición de la capacidad invasiva de los carcinomas. La expresión de caderina E se encuentra regulada por diversos elementos localizados en el promotor proximal del gen, entre lo que cabe destacar un elemento E-pal. Mediante la técnica del "one-hybrid" hemos identificado tres factores de transcripción (Snail, E12/E47 y E2-2A) que interaccionan con el elemento E-pal y que actúan como represores de la expresión de caderina E.

Publicaciones

Portillo, F. (2000). Regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim.Biophys.Acta- Rev. on Biomembrane*. 1469 31-42.

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, M.I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.F., Portillo, F., Nieto, M.A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell. Biol.* 2 76-83.

Gorgojo, B., Portillo, F., Martínez-Suárez, J.V. (2000). Sequencing and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Cryptococcus neoformans* cDNA encoding a plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1509 103-110.

Fuente, N.d.l., Maldonado, A.M., Portillo, F. (2000). The cell wall integrity/remodelling MAPK cascade is involved in glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1509 189-194.

Portillo, F. (2000). Genetic characterization of the ⁵³⁴DPPR motif of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim.Biophys.Acta*. 1468 99-106.

Gossens, A., Fuente, N.d.l., Forment, J., Serrano, R., Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20 7654-7661.

Pérez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, M.I., Portillo, F., Dhondt, G, Nieto, M.A., Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin

expression and Epithelial-Mesenchymal transitions. J. Biol. Chem. 276 27424-27431.

Tesis Doctoral

Natalia de la Fuente de los Llanos

"Aislamiento y caracterización de genes implicados en la regulación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2000. Director: Francisco Portillo. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Aislamiento y caracterización de genes implicados en la activación de la H⁺-ATPase de la membrana plasmática de levadura (*PB97-0054*) financiado por Dirección General de Investigación. Años 1998-2001

Identificación de factores de transcripción que regulan la expresión de caderina E. Evaluación de su implicación en el proceso de invasión tumoral (*08.1/0024.1/99*) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 2000-2003

Caracterización funcional de factores de transcripción implicados en la invasión tumoral (*08.1/0055.1/2000*) financiado por Comunidad autónoma de Madrid. Años 2001-2002

Papel del factor de transcripción A1/E47 de la familia bHLH en la invasión tumoral. Evaluación de su utilidad como marcador pronóstico (*01/1174*) financiado por Fondo Investigaciones Sanitarias. Años 2001-2002

Patentes

Snail, new tumoral progresion marker and target protein of new antitumoral compunds
WO 0102860

Palabras Clave

H⁺-ATPase, regulación por glucosa, transporte intracelular , análisis genómico, proteínas quinasas

Vías de señalización de la glucosa en levadura

Investigador principal	Sempere Couderc, Juana María (Gancedo), Profesor de Investigación
Becarios Postdoctorales	Zaragoza Hernández, Oscar (desde mayo 2000 hasta octubre 2001)
Becarios Predoctorales	Martín Belinchón, Mónica (desde noviembre 2000) Zaragoza Hernández, Oscar (hasta abril 2000) de Santiago, M. Reyes (desde febrero 2000 hasta octubre 2000) Rivero Baeza, Tanilo (hasta mayo 2000)
Personal de Apoyo	Bermúdez de Castro Risueño, María Isabel

Lineas de Investigación

Identificación de elementos implicados en el control del gen *FBPI* y de otros genes sometidos a represión catabólica

(M. Martín, T. Rivero, de Santiago, R., O. Zaragoza, J.M. Gancedo)

Después de realizar estudios con diversos mutantes afectados en la vía del cAMP hemos concluido que un descenso en la concentración intracelular de cAMP facilita la desrepresión de *FBPI* en *S. cerevisiae*, aunque el bloqueo de la expresión de *FBPI* por cAMP es solo transitorio. Se ha comprobado que los distintos elementos reguladores del promotor de *FBPI* responden de distinta manera a la concentración de glucosa en el medio.

En una fase anterior se seleccionaron genes que, expresados en multicopia, contrarrestaran la represión por el análogo no metabolizable de la glucosa, 2-deoxiglucosa. Entre ellos se han identificado el gen *DOG1* que codifica una deoxiglucosa-6P fosfatasa y genes reguladores como *MTH1* y un gen *GCR1* truncado.

Se han investigado los efectos de la delección del gen *GPR1* que codifica una proteína de membrana que podría actuar como sensor de la glucosa. Se ha observado que durante el crecimiento en glucosa no se afecta significativamente la represión de diversos genes analizados.

Regulación de la utilización de xilosa por *Saccharomyces cerevisiae*

(M. Martín, de Santiago, R., J.M. Gancedo)

En el marco de un proyecto europeo, se está intentando establecer las condiciones óptimas para la producción de etanol a partir de xilosa por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada por ingeniería genética para metabolizar la xilosa.

Publicaciones

Lafuente, M.J., Gancedo, C. Jauniaux, J.C., Gancedo, J.M. (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 35 161-172.

Zaragoza, O., Gancedo, J.M. (2000). Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. Antonie van Leeuwenhoek. 78 187-194.

Gancedo, J.M. (2001).) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 25 107-123.

Zaragoza, O., Gancedo, J.M. (2001). Elements from the cAMP signaling pathway are involved in the control of expression of the yeast gluconeogenic gene *FBPI*. FEBS Lett. 506 262-266.

Zaragoza, O., Vincent, O., Gancedo, J.M. (2001). Regulatory elements in the *FBPI* promoter respond differently to glucose-dependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 359 193-201.

Tesis Doctoral

Oscar Zaragoza Hernández

"Regulación de la expresión del gen *FBPI* de *Saccharomyces cerevisiae* y papel del cAMP en represión catabólica y morfogénesis". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2000. Director: Juana María Sempere.

Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Traslocación de transportadores de azúcares y transmisión de la señal de la glucosa en levadura (*PB97-1213-C02-01*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura. Años 1999-2001

Novel bioprocesses for hemicellulose upgrading (*LIFE/991/0225*) financiado por Unión Europea. Años 2000-2003

Palabras Clave

cAMP, fructosa-1, 6-bisfosfatasa, levadura, morfogénesis, represión catabólica, xilosa

**Departamento de Endocrinología
Molecular**

Papel de la hormona tiroidea y sus receptores en el desarrollo del encéfalo

Investigador principal	Bernal Carrasco, Juan, Investigador Científico
Investigadores Asociados	Guadaño Ferraz, Ana Contratada Ramón y Cajal
Investigadores Visitantes	De Groef , Bert Universidad de Lovaina
Becarios Postdoctorales	Morte Molina, Beatriz Vargiu , Pierfrancesco
Becarios Predoctorales	Abajo Llamero, Ricardo Díez Ruiz, Diego Escámez Toledano, M ^a José Manzano Moltó, Jimena
Personal de Apoyo	Chacón Gallardo, Gloria Hasta Diciembre de 2000 Moreno Egido, Eulalia Desde Marzo de 2001 García Marzullo, Vanesa Técnico de FP de Anatomía Patológica en practicas Martín Chamorro, Eduardo Tecnico de FP de Anatomía Patológica en prácticas
Estudiantes de Licenciatura	Fernández Marcos, Pablo Licenciatura de Bioquímica Jiménez González, Erika Programa de Iniciación a la Investigación
Colaboraciones	Javier De Felipe, Instituto Cajal Fredda Miller, MacGill University Carmen Sandi, UNED Thomas S. Scanlan, Universidad de San Francisco Alfonso Valencia, CNB Björn Vennström, Instituto Karolinska, Estocolmo

Lineas de Investigación

**Regulación génica por hormona tiroidea en el desarrollo del encéfalo:
mecanismo de acción de hormona tiroidea en la expresión de Ta1 a-tubulina**

(Petra Isabel Lorenzo, Catherine Ménard, Fredda Miller, Juan Bernal)

La hormona tiroidea (HT, T3) es un regulador importante del desarrollo, y juega un papel crucial en la maduración del sistema nervioso central (SNC). La deficiencia de HT durante períodos críticos produce alteraciones irreversibles de la estructura y función del SNC, que incluye retrasos en la diferenciación neuronal, con morfología anormal de las dendritas y alteraciones en el crecimiento de los procesos neuronales. Tanto los oligodendrocitos como las neuronas son células diana de HT. Estas células contienen receptores de T3 y expresan genes regulados por la hormona, gran parte de los cuales han sido indentificados en nuestro laboratorio. Algunos de estos genes están relacionados con procesos clave del crecimiento axonal y dendrítico, tales como los que codifican proteínas del citoesqueleto como tubulina. Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso de rata, se expresan dos genes α -tubulina, denominados Ta1 y T26, que son homólogos a los de ratón Ma1 y Ma2, respectivamente. T26 es de expresión constitutiva en células neuronales y no neuronales, mientras que Ta1 es específica de neuronas y su expresión está correlacionada con el crecimiento de procesos neuronales. La expresión de Ta1 es alta en períodos de rápido desarrollo, y disminuye a lo largo del período postnatal con la maduración terminal de las neuronas. La hormona tiroidea interviene en la regulación de la expresión de Ta1, que hemos estudiado mediante hibridación in situ, mediante un complejo mecanismo. En neuronas en cultivo primario la T3 induce una disminución rápida y transitoria, del mRNA. Este efecto aumenta si se bloquea la transcripción, lo que sugiere que el efecto de T3 se ejerce a nivel de degradación de mRNA. En ratones transgénicos que expresan b-galactosidasa bajo control del promotor de Ta1, la T3 regula in vivo la expresión del gen marcador de la misma forma que el gen Ta1 endógeno, lo que indica que el efecto de T3 in vivo se ejerce a nivel del promotor. Sin embargo, el promotor de Ta1 no es regulable in vitro en ensayos de transactivación empleando receptores de T3, tras transfección de células PC12, por lo que los efectos sobre el promotor in vivo son indirectos. La conclusión de este trabajo es que la regulación de Ta1 por T3 se debe a efectos combinados sobre la degradación del mRNA y efectos indirectos a nivel del promotor. (Publicado en Mol Cell Neurosci. 19: 333-343, 2002)

Los animales knock out del receptor de T3 TRa1 no presentan las alteraciones morfológicas del cerebelo inducidas por el hipotiroidismo.

(Beatriz Morte, Jimena Manzano, Thomas Scanlan, Björn Vennström, Juan Bernal)

La hormona tiroidea, T3, regula aspectos críticos del desarrollo del cerebelo, tales como la migración de células granulares y la diferenciación terminal de las células de Purkinje. La T3 actúa mediante receptores nucleares de dos tipos, denominados TRa1 y TRb (b1, b2 y b3). Estos receptores son factores de transcripción que

activan o reprimen la expresión de genes diana. En este trabajo hemos analizado la estructura del cerebelo en ratones deficientes (KO) de TRa1, durante el desarrollo del cerebelo, cuando esta isoforma representa al menos el 80% de la totalidad de receptor presente en cerebelo. En contra de lo que cabría esperar, dadas las acciones T3, la migración de células granulares y la diferenciación de células de Purkinje fueron normales en los ratones KO. La inducción de hipotiroidismo en ratones normales dio lugar a graves alteraciones de la migración y de la diferenciación de estas células. Sin embargo, sorprendentemente, la inducción de hipotiroidismo neonatal en los animales KO no tuvo ninguna consecuencia sobre estos dos parámetros. Es decir que los ratones KO parecían resistentes al hipotiroidismo. Este resultado apoya la idea de que parte del fenotipo de los animales hipotiroideos se debe a represión ejercida por el receptor en ausencia de la hormona más que la ausencia de hormona per se. Esta hipótesis se apoya en resultados obtenidos con el agonista de T3 específico de TRb, denominado GC-1. Este compuesto, a dosis fisiológicas induce la actividad de un gen indicador bajo control del promotor de timidina kinasa y el elemento de respuesta del gen específico de cerebro, RC3, cuando las células expresan TRb, pero no en células que expresan TRa. El tratamiento de animales hipotiroideos con T3, que se une a TRa y TRb, previene los defectos de la estructura del cerebelo debidos al hipotiroidismo. Sin embargo, el tratamiento con GC-1, que actúa sólo a través de TRb, no tuvo ningún efecto sobre la migración de células granulares, aunque fue capaz de normalizar la expresión de PCP-2, un gen específico de células de Purkinje. Estos datos están de acuerdo con la expresión de TRb por las células de Purkinje y de TRa por las células granulares. Los resultados, por tanto, indican que la hormona tiroidea tiene un efecto permisivo sobre la migración de las células granulares del cerebelo, mediante la des-represión ejercida por la isoforma TRaa1. Finalmente, los datos ayudan a comprender porqué los animales KO para el receptor de T3 no presentan el grave fenotipo característico del hipotiroidismo profundo. (Publicado en Proc Natl Acad Sci USA, 99: 3985-3989, 2002).

Alteraciones estructurales y del comportamiento en ratones adultos deficientes del receptor de T3 tipo a1 (TRa1)

(Ana Guadaño-Ferraz , Ruth Benavides-Piccione , Cesar Venero, Carmen Lancha , Bjorn Vennstrom , Carmen Sandi , Javier DeFelipe , Juan Bernal)

Los receptores nucleares de hormona tiroidea son factores de transcripción modulados por su ligando, T3, que regulan la expresión génica de muchos tejidos, incluido el sistema nervioso central. En mamíferos, dos genes localizados en distintos cromosomas, TRa y TRb, originan varias isoformas de receptor con diferentes patrones de expresión en tejidos y durante el desarrollo. Estas isoformas

son TRa1, TRb1, TRb2 y TRb3. Además hay formas truncadas procedentes de ambos genes. Con objeto de definir las funciones fisiológicas de los receptores de T3, en su conjunto, así como las funciones de cada una de las isoformas, se han generado ratones modificados genéticamente con deleciones en los genes del receptor, o bien que expresan formas mutadas con actividad dominante negativa. El fenotipo de los ratones deficientes de isoformas individuales o de todas las isoformas de receptor sólo se corresponde parcialmente con el de un animal hipotiroideo. En este trabajo hemos analizado la estructura del cerebro de ratones adultos deficientes de TRa1 y hemos correlacionado deficiencias sutiles en la estructura del cerebelo con el comportamiento. Se usaron 4 ratones adultos normales y 4 KO para TRa1. La estructura del cerebro se analizó mediante tinción de Nissl, que no reveló diferencia alguna entre los dos tipos de ratones. Sin embargo, la inmunohistoquímica específica para parvalbúmina (PV) y el transportador de GABA (GAT-1) reveló una reducción muy significativa en el número de terminaciones inmunoreactivas para PV y GAT-1 en las somas y dendritas proximales de las células piramidales de la región CA1 del hipocampo. Estos resultados sugieren una alteración de la transmisión GABAérgica perisomática en estas células. Para comprobar si estas alteraciones tienen consecuencias en el comportamiento, se sometieron los animales a pruebas de comportamiento de origen hipocámpico. En los tests de campo abierto, los animales KO revelaron una conducta menos exploradora que los normales. En el test de condicionamiento al miedo dependiente de contexto, los animales KO revelaron una conducta mucho más inhibida que los normales, que persistía una semana después del entrenamiento, mientras que no había diferencias en el test de condicionamiento al miedo dependiente de sonido, un test que revela alteraciones de la amígdala. Los resultados indican que la deficiencia de TRa1 tiene un efecto muy selectivo y sutil, de carácter permanente sobre la microestructura del hipocampo, que se refleja en una mayor emocionalidad y refuerzo de experiencias negativas, conductas típicas de los estados depresivos. (Estos resultados están en prensa en la revista *Molecular Psychiatry*).

Caracterización de Rhes: una proteína neuronal de la familia Ras regulada por hormona tiroidea.

(P. Vargiu, R de Abajo, P. Fernandez,, P Santisteban , P Crespo , J Bernal)

Previamente hemos descrito una nueva proteína de la familia Ras a la que hemos denominado Rhes (Ras homolog enriched in striatum), y cuya expresión está regulada por hormona tiroidea durante el desarrollo postnatal, especialmente en núcleo caudado. Rhes pertenece a una nueva subfamilia dentro de la familia Ras, a la que pertenece también Dexras, una proteína inducible por dexametasona en hígado. En nuestro laboratorio se intenta definir la implicación de Rhes en vías de

señalización. Rhes presenta la señal de farnesilación CSIQ en el extremo carboxilo terminal, y en células PC12, Rhes se localiza en la membrana plasmática. Mutaciones puntuales que afectan a la cisteína en esta secuencia suprimen su localización en membrana, así como los inhibidores de farnesilación. Rhes no une Raf ni afecta la actividad MAPK, pero estimula la actividad PI3K. Trabajos recientes han señalado que Dexras es una proteína activadora de la señalización por proteínas G (AGS, "activator of G protein signaling"). De acuerdo con estos resultados, en la actualidad estamos estudiando la posibilidad de que Rhes esté implicada en señalización a través de receptores adrenérgicos y de dopamina. La posibilidad de que Rhes esté implicada en la modulación de la transmisión dopaminérgica añade mayor importancia al estudio de la función de esta proteína.

Publicaciones

Alvarez, M., Cuadrado, A., Navarro, A.C., Sonderegger, P., Furley, J.A., Bernal, J., Muñoz, A. (2000). Regulation of the L1 cell adhesion molecule by thyroid hormone in the developing brain. . Mol. Cell . Neurosci., 16: 499-514, 2000. 16 499-514.

Vargiu, P., Morte, B., Manzano, J., Abajo, R., Abajo, R., Sucliffe, J.G., Bernal, J. (2001). Thyroid hormone regulation of rhes, a novel ras homolog gene expressed in the striatum. Mol. Brain Res. 94 1-8.

Bernal, J. (2001). Mecanismos de regulación por hormona tiroidea en el desarrollo neural. Endocrinología. 48 202-216.

Bernal, J. (2000). Regulación de la expresión génica en la síntesis de hormonas y sus receptores. En: Endocrinología básica y clínica. (Tresguerres, J.A. eds.). Editorial Síntesis, Madrid,

Bernal, J. (2001). Metabolismo y mecanismo de acción de las hormonas tiroideas. En: Endocrinología. (Jara, A. eds.). Editorial Panamericana, Madrid,

Tesis Doctoral

M^a José Escámez Toledano

"Modulación de la sensibilidad regional del cerebro, in vivo, a hormona tiroidea: expresión de receptores de T3 y desyodasas.". Universidad Autónoma de Madrid.

Facultad de Medicina. 2000. Director: Juan Bernal. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Rhes: una nueva proteína Ras del Núcleo estriado (*08.5/0044*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2001-2002

Neurodevelopmental disorders in premature infants caused by thyroid hormone insufficiency: Molecular basis for diagnosis and therapy (*QLG3-CT-2000-00930*) financiado por Unión Europea. Años 2000-2003

Implementacion y aplicacion de una tecnica de cDNA microarrays para el estudio simultaneo de la expresión de miles de genes (*PTR95.0385.OP*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología. Años 2000-2002

Mecanismos moleculares de regulacion génica por hormona tiroidea en cerebro: papel de los receptores nucleares como represores transcripcionales (*PM98-0118*) financiado por Ministerio de Educación, Cultura y Deportes. Años 1999-2002

Palabras Clave

hormona tiroidea, receptores nucleares, T3, T4, cerebelo, celulas de Purkinje, comportamiento, desarrollo, Rhes, Ras, estriado

Funciones y regulación de Ras y MAP kinasas

Investigador principal	Crespo Baraja, Piero, Científico Titular
Becarios Postdoctorales	Cañón Sánchez, Estela
Becarios Predoctorales	Arozarena Martinicorena, Imanol Casar Martínez, Berta Gómez Matallanas, David Sanz Moreno, Victoria Marta
Colaboraciones	Lafarga, Miguel Egea, Gustavo Bustelo, Xose León Javier Pandiella, Atanasio

Lineas de Investigación

Regulación del factor de Intercambio Ras-GRF

(I. Arozarena, E. Cañón)

Estudiamos los mecanismos por los que se regula la actividad de Ras-GRF. En concreto, actualmente estamos centrados en el estudio del papel que desempeña el dominio DH, presente en algunos de los factores de intercambio de Ras. Hemos observado que GRF activa potentemente ERK2, sin embargo un mutante de GRF que carece del dominio DH es incapaz de activar ERK2. Asimismo este mutante tampoco induce intercambio en Ras ni transformación celular. A tenor de estos resultados, observamos que un dominante inhibitorio de la GTPasa cdc42 inhibe el intercambio sobre Ras, la activación de ERK2 y la transformación inducidos por GRF. Aparentemente, cdc42 estaría involucrado en el control del proceso mediante el cual Ras-GRF se asocia a las membranas donde tiene lugar la activación de Ras. Actualmente estamos investigando la localización celular donde tiene lugar dicha interacción, así como la identificación de componentes adicionales que pudiesen mediar en este proceso.

Funciones diferenciales de las isoformas de Ras

(D. Gómez)

A pesar de que las isoformas de Ras; H, K y N-Ras son bien conocidas desde hace 20 años, hasta la fecha sus diferencias funcionales son prácticamente

desconocidas. Como abordaje para dilucidar esta cuestión, hemos generado mutantes dominantes inhibitorios asn 17 de H, K y N-Ras. Hemos observado que su especificidad inhibitoria es notablemente diferente. Así H-Ras N17 inhibe la activación de H, K y N-Ras, mientras que K-Ras N17 sólo inhibe la activación de K-Ras y N-Ras N17 es específico de N-Ras. Dichas diferencias podrían estar directamente asociadas a la distribución diferencial de las isoformas de Ras en distintos microdominios de la membrana plasmática.

Caracterización de la isoforma de p38, Mxi2.

(B. Casar, V.M. Sanz)

Recientemente hemos demostrado que la isoforma de splicing de p38, Mxi2 tiene propiedades bioquímicas notablemente diferentes a p38. Así, es potentemente activada por mitógenos, tiene un rango de sustratos distinto al de p38 y es insensible a la inhibición por piridinil imidazoles y fosfatasa dual. Recientemente hemos observado que Mxi2 interacciona directamente con ERKs, atenuando su tasa de desfosforilación, debido a lo cual Mxi2 potencia las funciones de ERKs como la transactivación de Elk-1. Interesantemente, esta potenciación se restringe a eventos nucleares ya que Mxi2 no afecta a las funciones de ERKs en citoplasma, tal y como la activación de RSKs.

Publicaciones

Delgado M.D., Vaqué J.P., Arozarena I., López-Illasaca M.A., , Martínez C., Crespo P., and León J. (2000). Ras proteins inhibit chronic myeloid leukemia cell growth and up-regulate p21Waf1 by a p53-independent, p19ARF and p16INK4a-dependent mechanism. *Oncogene*. 19 783-790.

Ajenjo N., Aaronson D.S., Ceballos E., Richard C , León J., and Crespo P. (2000). Myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 275 7189-7197.

Pena E., Berciano M.T., Fernandez R., Crespo P., and Lafarga M. (2000). Stress-induced activation of c-Jun N-terminal Kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibers. *Exp. Cell. Res.* 256 179-191.

Sanz V., Arozarena I., and Crespo P. (2000). Distinct carboxy-termini confer divergent characteristics to the Mitogen-Activated Protein Kinase p38a and its splice isoform Mxi2. *FEBS lett.* 474 169-174.

Arozarena I., Aaronson D.S., Matallanas D., Sanz V., Ajenjo N., Tenbaum S., Teramoto H., Ighishi T., Zabala J.C., Gutkind J.S., and Crespo P (2000). The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras-MAP Kinase by the exchange factor Ras-GRF. *J. Biol. Chem.* 275 26441-26448.

Du Villard J.A., Wicker R., Crespo. P., Russo D., Filetti S., Gutkind J.S., Sarasin A., and Suárez H.G. (2000). Role of the cAMP and MAPK pathways in the transformation of mouse fibroblasts by a TSHR gene constitutively activated by point mutation. *Oncogene.* 19 4896-4805.

Crespo P., and León J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell. Moll. Life Sci.* 57 1613-1636.

Arozarena I., Matallanas D., and Crespo P. (2001). Maintenance of Cdc42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP Kinase activation by the exchange factor Ras-GRF: Evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP, but unaffected by Cdc42-GTP. *J. Biol. Chem.* 276 21878-21884.

Tesis Doctoral

Nuria Ajenjo Diez

"Funciones de las MAP Kinasas ERK 1 y 2 en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis en células de leucemia mieloide". Universidad de Cantabria. Facultad de Medicina. 2001. Director: Piero Crespo. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Señalización mitogénica en la Leucemia Mieloide Crónica: rutas de activación de MAP kinasas como posibles dianas de terapia antineoplásica financiado por Fundación Marcelina Botín. Años 1997-2001

Activación y señalización diferencial de las proteínas Ras y sus implicaciones en el control del ciclo celular (*PM98-0131.*) financiado por DGICYT. PGC. Años 1999-2001

Regulation of the activation of Ras/MAP kinase pathway by Ras-GRF: role of the Dbl- homology (DH) domain and Cdc42 financiado por Association for International Cancer Research (AICR), . Años 2001-2004

Palabras Clave

Ras, Ras-GRF, MAP kinasas, p38, ERKs, Transducción de señales

Estudio funcional de la nueva proteína neuroespecífica Kidins220 y de la Proteína quinasa D en Sistema Nervioso.

Investigador principal	Iglesias Vacas, Teresa, Científico Titular
Investigadores Visitantes	Bartlett , Simon Robert King´s College London, UK
Becarios Predoctorales	Cárdenas Sanjur, David Bolívar Espinosa García, Ruth Higuero Romero, Alonso Miguel
Estudiantes de Licenciatura	Sánchez Ruiloba, Lucía
Colaboraciones	Bureik, Matthias. Saarland University, Saarbrücken, Alemania. Barrio, Luis, Hospital Ramón y Cajal, Madrid Rodríguez Peña, María Angeles Rodríguez-Fernandez, José Luis. Hospital Gregorio Marañón, Madrid. Rojas, José María, CNBF, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Schiavo, Giampietro. Cancer Research, Londres, UK Vázquez, Jesús. CBM, CSIC, Madrid

Lineas de Investigación

Estudio funcional de la nueva proteína neuroespecífica Kidins220 y de la Proteína quinasa D en sistema nervioso.

(R. Espinosa, L. Sánchez, T. Iglesias)

La Proteín quinasa D (PKD) es una nueva quinasa activada in vivo por un grupo de quinasas con conocidas implicaciones en la plasticidad sináptica y la función cerebral, la familia de la proteín quinasa C. Acabamos de clonar su primer substrato fisiológico, Kidins220 (Kinase D interacting substrate of 220 kDa), una proteína nueva neuroespecífica cuyo gen, altamente conservado en la escala evolutiva de eucariotas superiores (insectos, nematodos y mamíferos), presenta una única copia en el genoma humano. Hemos demostrado que Kidins220 es una proteína integral de membrana, que se acumula en las extensiones neuríticas y que

interacciona y es sustrato de PKD. Kidins220 también interacciona y se fosforila por receptores de neurotrofinas y efrinas. El hecho de que Kidins220 esté por debajo de las vías de señalización de neurotrofinas y efrinas (factores de supervivencia, morfogénesis y guía axonal, fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso), junto con su localización en el cono de crecimiento axonal, y la presencia en su secuencia de un dominio de interacción con proteínas PDZs (familia de conocida participación en la organización de la sinapsis), sugiere que Kidins220 puede jugar un papel muy importante en la función neuronal y en el desarrollo cerebral. El objetivo principal dentro de esta línea de investigación consiste en estudiar la función de Kidins220 y de PKD en los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica y la neurodegeneración. Estamos estudiando Kidins220 y PKD en el sistema nervioso durante el desarrollo y en el envejecimiento, analizando su participación en la diferenciación neuronal, la sinaptogénesis y la neurodegeneración. Para ello hemos establecido cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata E18. Para estudiar cómo se ven afectados todos estos procesos estamos utilizando dos aproximaciones, tratamientos con oligonucleótidos "antisentido" así como expresión ectópica de distintos mutantes en estos cultivos primarios de células de hipocampo y en la línea celular PC12 de rata. Mediante análisis de Western e inmunofluorescencia hemos observado que Kidins220 se expresa desde el día 0 y su expresión se mantiene durante más de 25 días en dichos cultivos, y que sólo está presente en la población neuronal y no en la astrocítica. También estamos realizando un análisis morfológico de las extensiones neuríticas, cono de crecimiento axonal y contactos sinápticos mediante un estudio de la colocalización de Kidins220 con distintos marcadores de distintos estadios de la diferenciación neuronal por microscopía confocal. Una vez caracterizado Kidins220 en estos cultivos primarios, los trataremos con oligonucleótidos "antisentido" y los transfectaremos con distintos mutantes que estamos generando en el laboratorio clonados en vectores de expresión eucariota. En paralelo vamos a analizar también el efecto de estas dos aproximaciones en cultivos de células PC12 diferenciadas con factor de crecimiento neurotrófico. Ya hemos observado que el tratamiento con desorganizadores del citoesqueleto afecta a la localización de Kidins220.

Identificación de complejos protéicos asociados a Kidins220 y a PKD en Sistema Nervioso

(D.B. Cárdenas, A.M. Higuero, T. Iglesias)

La identificación de nuevas moléculas que participen en neurogénesis y neurodegeneración, es uno de los objetivos prioritarios de la investigación biomédica, ya que estas moléculas pueden ser dianas para el desarrollo de futuras terapias que aminoren el gran impacto de las patologías neurodegenerativas en la

salud humana. Aquí, nuestro objetivo es identificar las proteínas que interaccionan con Kidins220 y PKD en el contexto de células de origen nervioso y de la terminal sináptica. Hemos unido covalentemente anticuerpos específicos de Kidins220 y de PKD a proteína A sefarosa y hemos realizado inmunoprecipitaciones a gran escala, en lisados de células PC12 así como en cerebro de rata. Tras separar los inmunoprecipitados en geles de SDS-PAGE hemos detectado varias bandas que son posibles candidatas a interaccionar específicamente y que identificaremos mediante secuenciación por espectrometría de masas. Una vez conocidas las proteínas asociadas, analizaremos la especificidad de la interacción y determinaremos los dominios implicados en la misma mediante ensayos de coimmunoprecipitación, ensayos de pull-down con proteínas de fusión de distintos dominios, expresión de mutantes de delección o puntuales y el sistema del doble híbrido.

Estudio del efecto de la actividad de PKD sobre el transporte y la estabilización de Kidins220.

(R. Espinosa, L. Sánchez, T. Iglesias)

Por ensayos de fosforilación in vitro e in vivo y mediante la generación de un anticuerpo fosfoespecífico hemos demostrado que Kidins220 se fosforila in vivo en el residuo Serina 919, que se encuentra dentro de una secuencia consenso de fosforilación por PKD. Nos interesa mucho saber si la fosforilación en este residuo por PKD modifica las propiedades de Kidins220. Hemos obtenido una serie de resultados que indican que la actividad de PKD está controlando tanto la localización como los niveles de Kidins220. Contamos con datos preliminares, en los que observamos la formación de agregados intracelulares conteniendo complejos de Kidins220/PKD en células PC12 transfectadas de manera transitoria con el dominante negativo de PKD. Por otro lado, experimentos de expresión transitoria de PKD y sus mutantes junto con Kidins220 en células COS-7 muestran una desaparición de Kidins220 en presencia del dominante negativo de PKD y un aumento de sus niveles cuando se co-expresa con el mutante constitutivamente activo en ensayos de Western. Estos datos parecen indicar que PKD controla el transporte, la estabilidad o la degradación de Kidins220. Estamos generando dos mutantes en los que se sustituye la Ser919 por un residuo neutro no fosforilable como la alanina o por un residuo ácido, como el ácido glutámico, cuya carga negativa mimetiza la carga negativa del fosfato y que aparentará una fosforilación constitutiva. Con estos mutantes nos proponemos establecer el papel que juega la fosforilación en la posible regulación de la estabilidad de Kidins220 por fosforilación mediada por PKD.

Publicaciones

Matthews, S., Iglesias, T., Rozengurt, E. & Cantrell, D. (2000). Spatial and temporal regulation of Protein Kinase D (PKD) by antigen receptors. *EMBO Journal*. 19 2935-2945.

Pombo, PMG, Baretino, D, Espliguero, G, Metsis, M, Iglesias, T & Rodríguez-Peña (2000). Transcriptional repression of neurotrophin receptor *trkB* by thyroid hormone in the developing rat brain. *J. Biol. Chem.* . 275 37510-37517.

Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M.P., Naven, T.J., Rozengurt, E. & Schiavo, G. (2000). Identification and cloning of *Kidins220*, a novel neuronal substrate for Protein Kinase D. *J. Biol. Chem.* . 275 40048-40056.

Waldron, R.T., Rey, O, Iglesias, T., Tugal, T., Cantrell, D. & Rozengurt, E. (2001). Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J. Biol. Chem.* 276 32606-32615.

Financiación

Participación de la nueva proteína neuroespecífica *Kidins220* y de PKD en los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica y la neurodegeneración (*SAF2001-1703*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología. Años 2001-2004

Patentes

Novel compounds and methods related to a physiological substrate for PKD/PKC μ and methods of use: Rat *Kidins220* polynucleotide and polypeptides sequences and antibodies
Re No US 60/230,449

Palabras Clave

Efrinas, Guía axonal, *Kidins220*, Neurogénesis, Neurodegeneración, Neurotrofinas, Plasticidad sináptica, Proteína quinasa C, Proteína quinasa D, Sinaptogénesis, Transducción de señales, Transporte

Regulación de la expresión génica por receptores hormonales en cáncer y diferenciación neuronal

Investigador principal

Jiménez Cuenca, Benilde, Profesor Titular UAM

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

Investigador principal	Morreale de Castro, Gabriela, Dr. Ad Honorem
Investigadores	Escobar del Rey, Francisco
Asociados	Obregón Perea, María Jesús
Investigadores	Darras, V. Prof. Endocrinología Comparada, Universidad de
Visitantes	Lovaina, Bélgica Palha, J., Investigador, Instituto de Biología Mol. Celular, Oporto, Portugal
Becarios	Arufe Gonda, María
Postdoctorales	
Becarios Predoctorales	Lavado Autric, Rosalia
Personal de Apoyo	Duran Ruiz, M. Socorro Presas Castilla, M. Jesús
Colaboraciones	Hume, R. (Universidad de Dundee, Escocia) Visser, T. (Universidad de Rotterdam, Países Bajos)) Darras, V. (Universidad de Lovaina, Bélgica) Berbel, P. (Neurociencias, Alicante) Ares, S. (La Paz, Madrid) Jauniaux, E. (King´s College de Londres, Reino Unido) van der Heide, D. (universidad de Wageningen, Países Bajos) Palha, J. (Instituto de Biología Molecular y Celular, Oporto, Portugal)

Lineas de Investigación

Metabolismo de iodotironinas en diferentes areas del cerebro fetal humano

(R. Hume , T. J. Visser , M. J. Obregón , G. Morreale de Escobar)

En trabajos anteriores hemos demostrado que durante las primeras 18 semanas de gestación, los tejidos del feto humano están expuestos a concentraciones de

tiroxina (T4) “libre” comparables a las que se consideran biológicamente relevantes en el adulto. Hemos tenido ahora la posibilidad de estudiar las concentraciones de las hormonas T4 y triyodotironina (T3), así como del metabolito inactivo triyodotironina reversa (rT3) en 9 zonas diferentes del cerebro de fetos normales de 13 a 20 semanas de gestación, y de prematuros fallecidos por diferentes causas entre las 24-42 semanas. Asimismo, se ha medido la actividad de las dos enzimas desyodantes, tipo II (D-II) y tipo III (D-III).

Se han encontrado importantes diferencias entre diferentes áreas cerebrales, y a distintas edades de desarrollo. Ambas enzimas juegan un papel muy importante en la regulación de la concentración de T3 (la forma hormonal activa). En modo especial, la D-III, que al disminuir la T3 intracelular, limita la exposición de diferentes áreas cerebrales a la dicha hormona, hasta que ésta se hace necesaria para la inducción de la diferenciación.

El objetivo de esta línea es conocer las características especiales del metabolismo cerebral de hormonas tiroideas durante el desarrollo, información indispensable para planificar posibles pautas del tratamiento hormonal de la hipotiroxinemia de “grandes” prematuros.

Deficiencia de yodo e hipotiroxinemia en niños prematuros

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

Los estudios realizados en años anteriores en prematuros de 27-36 semanas de edad gestacional, ingresados en el Servicio de Neonatología de La Paz (Dr. J. Quero) pusieron claramente de manifiesto que estos niños tienen niveles muy bajos de tiroxina sérica libre (FT4) y de tri-yodo-tironina (T3), comparados con los de neonatos a término. El grado de hipotiroxinemia de los prematuros no sólo dependía de su edad gestacional, sino también de la cantidad de yodo que ingirieron después de nacer. Esta cantidad resultó ser insuficiente en la mayoría de los preparados para su alimentación.

Se ha estudiado el desarrollo mental y psicomotor de estos prematuros a los 4 años de edad, encontrándose que era inferior en aquellos niños que tuvieron concentraciones bajas de T4 ó FT4 durante el período postnatal, sobre todo si esta situación se prorrogó durante los primeros dos meses de vida.

Se está repitiendo este estudio en prematuros de menor edad gestacional (<30 semanas), pero alimentados con fórmulas de mayor contenido en yodo que las usadas previamente. Se está midiendo el desarrollo psicomotor a los 6, 12, 18 y 24 meses de edad. Los datos son aún muy preliminares, pero ya se ha encontrado que, a pesar del mayor grado de prematuridad respecto a la de los niños del estudio anterior, los valores de T4, FT4 y T3 son superiores. Se está aclarando si

esto se debe a la mayor ingesta de yodo o a cambios en los hábitos de medicación. Una evaluación preliminar de los resultados indica que los niños con más problemas de desarrollo siguen siendo los que tuvieron una menor ingesta de yodo.

Alimentación parenteral de neonatos prematuros:

(M. Ibrahim , T. J. Visser , C. A. Barnett , M.S. Duran, M.J. Presas, F. Williams , R. Hume)

Los neonatos muy prematuros pueden necesitar alimentación exclusivamente parenteral durante semanas. Hemos realizado un balance muy exhaustivo de la ingesta y de la excreción urinaria de yodo, durante 4 períodos de 24 horas, a día 1, 7, 14, y 28 después del nacimiento, de prematuros de 24 a 29 semanas de gestación. Asimismo, se han valorado en suero las concentraciones de hormonas tiroideas y otros parámetros de función tiroidea.

Se ha encontrado que la mayoría de los neonatos a alimentación parenteral ingieren cantidades de yodo que son unas 30 veces inferiores a las recomendadas, estando además en balance de yodo negativo hasta que la mayor parte del alimento que reciben es administrado por vía enteral, con preparados que contienen las cantidades de yodo recomendadas.

Se encontró también que durante el período neonatal estudiado, la T3 circulante fue tanto más baja cuanto inferior era la cantidad de yodo ingerida por el prematuro. Debido a las consecuencias negativas que esto puede tener en el futuro desarrollo mental del niño, se ha comenzado un estudio a doble ciega, con suplementación controlada del contenido en yodo de las soluciones usadas para alimentación parenteral.

Deficiencia de yodo e hipotiroxinemia materna en España

(F. Escobar del Rey, R. Lavado, J. Sánchez Vega , M.S. Duran, M.J. Presas, G. Morreale de Escobar)

Estudios anteriores nuestros y de otros grupos europeos indican que, mientras no se suministren diariamente entre 200-300 μg de yodo a las mujeres desde el comienzo del embarazo, va a ser difícil erradicar todas las disfunciones del sistema nervioso central causadas por la deficiencia de este micronutriente, sobre todo aquellas que se iniciaron durante el desarrollo fetal temprano.

Nuestros estudios al respecto, realizados en zonas de grave deficiencia de yodo, como la de Las Hurdes Altas, se han extendido ahora a toda Extremadura. Se está terminando la recogida de los datos analíticos obtenidos en orina y suero de unas

800 mujeres embarazadas escogidas por criterios epidemiológicos como representativas de zonas urbanas y rurales tanto de Cáceres como de Badajoz.

Los datos preliminares muestran que un 40 % de ellas ingiere menos de la mitad de la cantidad recomendada. Como consecuencia, durante el primer trimestre no han podido aumentar los niveles de T4 libre circulante, al contrario de lo que ocurre en mujeres con ingesta adecuada. Esto puede tener consecuencias negativas para el desarrollo mental del feto. Urge suplementar la ingesta de yodo con 200-300 µg I /día, desde el comienzo del embarazo, o desde antes, tal y como se suplementa la ingesta de folatos.

Se está extendiendo este tipo de estudios a las mujeres embarazadas de otras zonas de España, siguiendo nuestro protocolo. Los datos indican que este problema está muy extendido.

Deficiencia de yodo e hipotiroxinemia materna en Escocia

(C.A.Barnett , T.J.Visser , F.Williams , M.S. Duran, M.J. Presas, R.Hume , F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar)

Se está completando un estudio en 500 mujeres embarazadas y 100 no embarazadas, todas ellas normales, siguiendo el mismo protocolo que se describe en el párrafo anterior. Las mujeres viven en Tayside, Dundee, en Escocia. Los datos demuestran que la excreción urinaria de yodo (equivalente a la ingesta) de las mujeres embarazadas es igual a la de las no embarazadas, a pesar de que sus necesidades diarias se dupliquen.

Un 40 % aproximadamente de estas mujeres escocesas ingiere menos de la mitad de las cantidades de yodo que se recomiendan. Como consecuencia, su T4 libre durante el primer trimestre no aumenta hasta las concentraciones que se encuentran en las embarazadas que ingieren cantidades suficientes de yodo. Se reproduce la situación que se está encontrando en España, a pesar de que el Reino Unido se viene considerando como una parte de Europa sin deficiencia de yodo.

Debido a las consecuencias de la hipotiroxinemia materna en el desarrollo del cerebro del feto durante fases tempranas del embarazo, urge implementar en toda Europa la suplementación de la alimentación de la embarazada con comprimidos de KI, si los hubiera en el país, o con suplementos vitamínicos-minerales que contienen este micronutriente esencial, tal y como se viene haciendo con los folatos.

Hipotiroxinemia materna y migración de células cerebrales.

(R. Lavado, E. Ausó, M. Arufe, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar, P. Berbel, M.S. Duran)

Se han ido completando estudios iniciados anteriormente, que han ido demostrando que las ratas nacidas de madres deficientes en yodo presentan cambios irreversibles de la citoarquitectura de la corteza cerebral. El modelo experimental consiste en alimentar ratas hembras con una dieta muy pobre en yodo (dieta LID), la misma dieta suplementada con cantidades fisiológicas de yodo (LID+I, controles de las ratas a LID), o la dieta habitual del criadero (pellets). Se inyectan hembras de cada grupo experimental con Bromo-deoxiuridina (BrdU) a edad embrionaria de 14, 15 y 16 días (subgrupo E14-16) o a edad embrionaria de 17, 18 y 19 días (subgrupo E17-19). Se estudiaron sus cerebros a los 40 días de vida postnatal, cuando las diferentes estructuras están ya bien definidas.

Con este protocolo las hembras preñadas son muy hipotiroxinémicas, pero no son clínicamente hipotiroideas por tener concentraciones normales de T3 circulante. El número de fetos de cada camada, y su peso, es igual que el de sus controles (madres LID+I ó a pellets), al contrario de lo que ocurre en ratas realmente hipotiroideas, en las que tanto la T4 como la T3 circulantes son muy bajas y su capacidad reproductora está muy afectada.

Tanto en neocorteza como en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de las crías de las madres LID hipotiroxinémicas había células BrdU+ heterotópicas que aparecieron en sustancia blanca subcortical (inyec. E14-E16), o en número aumentado en capa V (inyec. E17-E19), a costa del número que migra a la capa que les correspondería normalmente. En el hipocampo se observan numerosas células heterotópicas, tanto en CA1 como CA3. También aparecen alteraciones en la citoarquitectura de la zona de barriles.

Experimentos aún en curso con otro modelo experimental muestran que basta un período muy corto de hipotiroxinemia materna moderada entre E13 y E15 para que se altere todo el proceso de migración de células cerebrales hacia la corteza somatosensorial y el hipocampo.

Estos resultados son los primeros que demuestran alteraciones irreversibles de maduración cerebral debidos a hipotiroxinemia materna, sin hipotiroidismo materno ni fetal.

Mecanismos de adaptación del tiroides fetal a la deficiencia de yodo

(M. Arufe, M.J. Obregón, R. Lavado, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar)

La glándula tiroides reacciona rápidamente a una disminución del yoduro circulante con varios mecanismos que facilitan la síntesis y secreción preferencial de T3 con respecto a T4. En adultos, juegan un papel esencial en esta respuesta tres genes: NIS (transportador de yodo), y las yodotironina desyodasas D-I y D-II, que generan T3 a partir de la T4 procedente de la hidrólisis de la tiroglobulina, previa secreción de estas hormonas yodadas al torrente circulatorio. En adultos, la expresión, tanto de NIS como de D-I, está controlada por las concentraciones circulantes de hormona tirotrópica.

Se está estudiando si estos mecanismos ya son operativos al comienzo de la función tiroidea del feto, y si la deficiencia de yodo de la madre los estimula.

Publicaciones

Escobar-Morreale, H., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (2000). Fisiología del tiroides. En: Actualizaciones en Endocrinología-5: Tiroides. (C. Dieguez, C. Pavía, R. Yturriaga eds.). McGraw-Hill-Inteamericana, Madrid, pp. 1-39.

Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. (2000). Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism, or to maternal hypothyroxinemia?. *J Clin Endocrinol Metab*. 85 3975 -3987.

Palha, J.A., Fernandes, R., Morreale de Escobar, G., Episkopou, V., Gottesman, M., Saraiva, M.J. (2000). Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: Study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology*. 141 3267-3272.

Ng, L., Pedraza, P.E., Vennström, B., Curran, T., Morreale de Escobar, G., Forrest, D. (2001). Audiogenic seizure susceptibility in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Neuroreport*. 12 2359-2362.

Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (2000). El yodo durante la gestación, lactancia y primera infancia. Cantidades mínimas y máximas: de microgramos a gramos. *An Esp Pediatr*. 53 1-5.

Morreale de Escobar, G. (2001). The role of thyroid hormone in fetal neurodevelopment. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 14 1453-1462.

Escobar del Rey, F., Bernal, J., Obregón, M.J., Escobar-Morreale, H.F., Morreale de Escobar G. (2000). Fisiología del Tiroides. En: Tratado de Endocrinología

Básica y Clínica. (Tresguerres, J.A.F., Aguilar, E., Devesa, J., Moreno, B. eds.). Editorial Síntesis, S. A, Madrid, 2 pp. 1115-1158.

Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (2000). Hormonas tiroideas durante el desarrollo fetal: Comienzo de la función tiroidea y transferencia materno-fetal. En: Tratado de Endocrinología Básica y Clínica. (Tresguerres, J.A.F., Aguilar, E., Devesa, J., Moreno, B. eds.). Editorial Síntesis, S. A, Madrid, 2 pp. 1159-1190.

Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (2000). Disfunciones por deficiencia de yodo y bocio endémico. En: Tratado de Endocrinología Básica y Clínica. (Tresguerres, J.A.F., Aguilar, E., Devesa, J., Moreno, B. eds.). Editorial Síntesis, S. A., Madrid, 2 pp. 1323-1332.

Financiación

Función tiroidea materna y fetal y desarrollo cerebral: Investigaciones Experimentales y epidemiológicas (*Proyecto 99/0852. IP: G. Morreale de Escobar*) financiado por Fondo de investigaciones Sanitarias. Años 1999-2001

Regulación por las hormonas tiroideas maternas de la tasa de proliferación, y de la migración celular durante la neurogénesis cortical de la rata. Modelo experimental para la prevención de déficits neurológicos causados por hipotiroxinemia materna. (*Proyecto 08.5/0041/1998. IP: G. Morreale de Escobar*) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 1999-2000

Neurodevelopmental disorders in premature infants caused by thyroid hormone insufficiency-molecular basis for diagnosis and therapy. (*QLG3-CT-2000-00930, IP: G. Morreale de Escobar*) financiado por Unión Europea. Años 2000-2003

Title: Neurodevelopmental disorders in premature infants caused by thyroid hormone insufficiency-molecular basis for diagnosis and therapy. (*SAF2000-2805-CE. IP: G. Morreale de Escobar*) financiado por Dirección General de Ciencia y Tecnología. Años 2000-2003

Estudio epidemiológico del estado de la nutrición en yodo de mujeres embarazadas extremeñas. (*IP: F. Escobar del Rey*) financiado por Junta de Extremadura. Años 1999-2001

Premios

Doctorado en Medicina Honoris Causa, por la Universidad de Alcalá (2001)

Palabras Clave

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

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

Investigador principal	Muñoz Terol, Alberto, Profesor de Investigación
Investigadores Asociados	Jiménez Cuenca, Benilde Profesora Asociada (desde 1997 hasta octubre 2001) Profesora Titular (desde octubre 2001)
Investigadores Contratados	Cuadrado García, Ana(desde junio 2001) Díaz-Ropero Briz, Arturo(desde 2000 hasta marzo 2001) González Santiago, Laura(desde abril 2001)
Becarios Postdoctorales	García Pálmer, Héctor(desde septiembre 2001) González Sancho, José Manuel(desde mayo 1998 hasta noviembre 2000) Alvarez Dolado, Manuel(desde noviembre 1997 hasta octubre 2000) García Fernández, Luis Francisco(desde noviembre 1996 hasta julio 2001) González Meana, M ^a Victoria(desde septiembre 1997 hasta abril 2000)
Becarios Predoctorales	García Pálmer, Héctor(desde septiembre 1997 hasta septiembre 2001) González Sancho, José Manuel(desde julio 1993 hasta mayo 1998) Ordóñez Morán, Paloma(desde septiembre 2001) Larriba Muñoz, M ^a Jesús(desde septiembre 2001) Alvarez Dolado, Manuel(desde septiembre 1992 hasta noviembre 1997) García Fernández, Luis Francisco(desde septiembre 1991 hasta noviembre 1996) Alcaide Mora, Victoria E.(desde 2001) Cuadrado García, Ana(desde mayo 1996 hasta mayo 2000) Fernández García, Nuria Isabel(desde octubre 2000) Figueroa Conde-Valvís, Angélica(desde 1999) Navarro Yubero, Ana Cristina(desde abril 1998) Tenbaum , Stephan Paul(desde 1998)
Personal de Apoyo	González Monge, Margarita(desde febrero 1994)

Colaboraciones	Martínez Saura, M ^a Teresa(desde octubre 1998)
	García de Herreros, A. (Universidad Pompeu Fabra)
	Cano, A. (IIB)
	Quintanilla , M. (IIB)
	Bonilla , F. (Clínica Puerta de Hierro)
	Bernal, J. (IIB)
	Lafarga, M. (Universidad de Cantabria)
	Caelles, C. (Universidad de Barcelona)
	Mayor Jr, F. (CBM)
	Pinazo-Durán, MD (Hospital de la Fe, Valencia)
	Baniahmad, A. (Universidad de Giessen, Alemania)
	Urade, Y (Osaka Bioscience Institute, Osaka)
	Bouck, N. (Northwestern University, Chicago)
	Zenke, M. (Max-Delbrück Center, Berlín)
	Pharma Mar, S.A. (Madrid)

Lineas de Investigación

Mecanismo de acción de la vitamina D en células de cáncer de colon humano

(H. García, J.M. González, P. Ordóñez, M.J. Larriba, A. Muñoz, en colaboración con , A. García de Herreros (Universidad Pompeu Fabra), A. Cano (IIB), M. Quintanilla (IIB), F. Bonilla (Clínica Puerta de Hierro))

Investigamos los efectos de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D₃, derivado activo de la vitamina D, y de varios análogos no hipercalcémicos que están actualmente en experimentación clínica en células humanas de cáncer de colon. Hemos comprobado que estos compuestos promueven la diferenciación e inhiben la proliferación celular a través de un doble mecanismo: la inducción de la expresión del gen que codifica la proteína de adhesión intercelular E-cadherina y la inhibición de la actividad transcripcional de la β -catenina. Se ha comprobado que la adición de sus ligandos aumenta la unión del receptor de la vitamina D (VDR) con la β -catenina en el interior del núcleo y posteriormente la re-localización de β -catenina desde el núcleo a la membrana plasmática, donde forma complejos con E-cadherina. Estamos tratando de identificar genes diana de la vitamina D en estas células y la regulación del VDR, así como la importancia de estos mecanismos en tumores de colon humanos.

Efectos de la hormona tiroidea células de epitelio de mama y análisis de la expresión e integridad de sus receptores (TR/erbA) en tumores de mama humanos

(J.M. González, A. Figueroa, A. Muñoz, A. Muñoz en colaboración con , F. Bonilla (Clínica Puerta de Hierro))

Continuado la investigación sobre los efectos de la hormona tiroidea en células EpH4 de epitelio de mama, hemos comprobado que causa una disminución en la capacidad proliferativa, que es acompañada por una inhibición en la expresión de los genes ciclina D1 y T1. El gen T1 es inducido por ras, fos y otros oncogenes, mitógenos y citoquinas y codifica dos proteínas, una de secreción y otra asociada a la membrana plasmática que ha sido asociado a la etapa de proliferación celular de la glándula mamaria. Además, en colaboración con el grupo del Dr. F. Bonilla hemos llevado a cabo un estudio de la integridad y expresión de los genes que codifican los receptores nucleares de la hormona tiroidea, TR α y TR β , en carcinomas de mama humanos. Hemos identificado la existencia de formas mutadas de TR β 1 en una cierta proporción de tumores, así como una serie de alteraciones en los niveles de expresión de las formas TR α 1 y TR β 1 respecto al tejido mamario normal.

Mecanismo de acción antiangiogénica de la Trombospondina-1 (TSP-1) y el Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF)

(B. Jiménez, N.I. Fernández, A. Muñoz, en colaboración con N. Bouck (Northwestern University, Chicago))

Hemos determinado que el mecanismo de acción antiangiogénica y antitumoral de la trombospondina-1 (TSP-1) es consecuencia de su capacidad para inducir apoptosis de forma específica en las células endoteliales activadas. Utilizando distintos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo* (ensayos de angiogénesis utilizando ratones *knockout* para CD36, fyn o JNK) hemos identificado varios de los elementos de señalización que median el efecto biológico de este factor antiangiogénico: el receptor de membrana CD36 y las proteínas quinasas Fyn, p38MAPK y JNK-1. El efecto antiangiogénico de TSP-1 requiere la activación de caspasa-3 y caspasa-8. Hemos iniciado el estudio del mecanismo de acción del factor antiangiogénico PEDF y su acción antitumoral en neuroblastomas.

Mecanismo de acción de nuevos agentes antitumorales de origen marino

(A. Cuadrado, L. González, V.E. Alcaide, M.T. Martínez, A. Muñoz en colaboración con el Departamento de Investigación de Pharma Mar, S.A.)

En colaboración con el Departamento de Investigación de Pharma Mar S.A., hemos iniciado el estudio del mecanismo de acción de nuevos agentes antitumorales actualmente en experimentación clínica (Ecteinascidina-743, Aplidina y Kahalalido F) propiedad de la compañía. Estamos analizando su acción

en células humanas derivadas de distintos tipos de cánceres con objeto de identificar sus dianas y efectos a nivel molecular y celular.

Identificación y estudio de genes regulados por hormona tiroidea en el sistema nervioso central

(A. Cuadrado, A.C. Navarro, S.P. Tenbaum, A. Figueroa, M. Alvarez, A. Muñoz en colaboración con , J. Bernal (IIB), F. Mayor Jr (CMB), M. D. Pinazo (Hospital de la Fe, Valencia), Y. Urade (Osaka Bioscience Institute, Osaka), A. Baniahmad (Universidad de Giessen), M. Zenke (Max-Delbrück Center, Berlin))

Hemos descubierto la regulación por hormona tiroidea de los genes L1-NCAM y TAG-1, que codifican proteínas de adhesión celular implicadas en reconocimiento, crecimiento y guía axonal y otros procesos. Además, hemos estudiado la regulación del gen Alien, cuyo producto es un co-represor transcripcional que participa en la inhibición de la expresión génica por el receptor de la hormona tiroidea TR. Asimismo, se ha demostrado que el gen L-PGDS, que codifica por la forma de tipo lipocalina de la prostaglandina D2 sintasa, previamente caracterizado por nosotros como regulado por hormona tiroidea en el cerebro de rata, es inducido por glucocorticoides, y que la adición de hormona tiroidea potencia el efecto del glucocorticoide sintético dexametasona. El tratamiento con dexametasona induce transcripcionalmente la expresión del gen L-PGDS en neuronas hipotalámicas en cultivo, causando un aumento en los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática. Hemos observado que la expresión de los genes que codifican la proteína quinasa 2 de receptores asociados a proteínas G (GRK2) y β -arrestina 1 es alterada por el hipotiroidismo en el cerebro. En otros tejidos (corazón, hígado y pulmón) la expresión de GRK2 está también regulada por el estado tiroideo. Otro gen cuya expresión está bajo el control de la hormona tiroidea es tubby, implicado en degeneración neuronal y obesidad. Otros genes objeto de estudio son musashi-1 y huD, que codifican proteínas de unión a RNA, y neurotripsina y neuroserpina, que codifican respectivamente una serín-proteasa y un inhibidor de estas proteasas de la familia de las serpinas. Finalmente, estamos también investigando los efectos del hipotiroidismo durante el desarrollo del globo ocular, particularmente de la retina, donde hemos comprobado que la deficiencia de hormona tiroidea causa alteraciones morfológicas y celulares.

Inhibición del factor de transcripción AP-1 (Jun/Fos) por receptores nucleares

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

Existe un antagonismo funcional entre el factor AP-1, compuesto por proteínas de las familias de los proto-oncogenes Jun y Fos, y algunas hormonas con receptores nucleares. Hemos profundizado en los estudios que nos permitieron identificar a la ruta de la JNK ("c-Jun N-terminal kinase") como una diana de inhibición por glucocorticoides, hormona tiroidea, ácido retinoico y vitamina D en extractos de diversos tipos de células (Caelles et al., *Genes & Dev.*, 11, 3351-3364, 1997). Se ha comprobado por inmunofluorescencia y microscopía confocal que el glucocorticoide sintético dexametasona es capaz de inhibir la fosforilación de c-Jun por JNK y la acumulación de c-Jun en células intactas, y que ello ocurre sin inhibir la translocación al interior nuclear de JNK. La dexametasona inhibe la activación de JNK inducida por TNF- α o radiación ultravioleta tanto en el citosol como en el núcleo, provocando la acumulación nuclear de JNK inactiva.

Publicaciones

Jiménez, B., Volpert, O.V., Febbraio, M., Silverstein, R.L. and Bouck, N (2000). Signals leading to apoptosis dependent-inhibition of neovascularization by Thrombospondin-1. *Nature Medicine*. 6 41-48.

García, L.F., Miguel Angel Iñiguez, Naomi Eguchi, Manuel Fresno, Yoshihiro Urade and , Muñoz, A. (2000). Dexamethasone induces lipocalin-type Prostaglandin D Synthase gene expression in mouse neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*. 75 460-470.

Penela, P , Alvarez, M., Muñoz, A. Mayor Jr, F (2000). Expression pattern of the regulatory proteins G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and b-arrestin 1 during rat postnatal brain development. Effect of hypothyroidism. *Eur. J. Biochem*. 267 4390-4396.

González, M.V., Jiménez, B. Berciano, MT , González, J.M., Caelles, M.d.C. Lafarga, M , Muñoz, A. (2000). Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *Journal of Cell Biology*. 150 1199-1208.

Alvarez, M., Cuadrado, A., Navarro, A.C. Peter Sonderegger, Andrew J. Furley , Bernal, J., Muñoz, A. (2000). Regulation of the L1 cell adhesion molecule by

thyroid hormone in the developing brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 16 499-514.

Jiménez, B., Volpert, V (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *Journal of Molecular Medicine* . 78 663-672.

Jiménez, B., O.V. Volpert, F. Reiher, L. Chang, A. Muñoz, M. Karin and N. Bouck (2001). JNK activation is required for the inhibition of neovascularization by trombopondin-1. *Oncogene*. 20 3443-3448.

Penela P., Barradas M., Alvarez-Dolado M., Muñoz A., and Mayor Jr F. (2001). Effect of hypothyroidism on G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) expression levels in rat liver, lung and heart. *Endocrinology*. 142 987-991.

Koritschoner N.P., Alvarez-Dolado M., Kurz S.M., Heikenwälder M.F., Vogel F., Muñoz A. and Zenke M. (2001). Thyroid hormone regulates the obesity gene tub. *EMBO Reports*. 2 499-504.

García, H., González, J.M., Espada, J. María T. Berciano, Isabel Puig, Josep Baulida, Miguel Quintanilla, Amparo Cano, , Muñoz, A. (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of b-catenin signaling. *Journal of Cell Biology*. 154 369-388.

M. José Gamborino, Enrique Sevilla-Romero, Alberto Muñoz, José Hernández-Yago , Jaime Renau-Piqueras, and M. Dolores Pinazo-Durán (2001). Role of thyroid hormone in craniofacial and eye development using a rat model. *Ophthalmic Research*. 33 283-291.

Alvarez, M., Figueroa, A. Serguei Kozlov, Peter Sonderegger, Andrew J. Furley, and , Muñoz, A. (2001). Thyroid hormone regulates TAG-1 expression in the developing rat brain. *European Journal of Neuroscience*. 14 1209-1218.

Tesis Doctoral

Ana Cuadrado García

"Efecto de la hormona tiroidea sobre la expresión de genes implicados en mecanismos de regulación post-transcripcional en cerebro". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Alberto Muñoz. Calificación: Apto "cum laude".

Héctor García Pálmer

"Efectos de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en células de cáncer de colon humano". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2001.
Director: Alberto Muñoz. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

"The role of axonal cell adhesion molecules in optic nerve regeneration" (*BMH4-CT97-2653*) financiado por Unión Europea. Años 1997-2000

"The role of axonal cell adhesion molecules in optic nerve regeneration" (*SAF97-1907-CE*) financiado por Plan Nacional de I + D, Programa de Salud. Años 1998-2000

"Efectos de ErbA y otros receptores hormonales nucleares en diferenciación celular y progresión tumoral. Establecimiento de sistemas modelo para la búsqueda de anti-angiogénicos y neurofármacos" (*SAF98-0060*) financiado por Plan Nacional de I + D, Programa de Salud. Años 1998-2001

"Aislamiento y estudio de nuevas moléculas con actividad antiproliferativa, inmunosupresora, y/o antiinflamatoria" (*IFD97-0281-C02-01*) financiado por Plan Nacional de I + D, Proyectos financiados con Fondos FEDER. Años 1998-2001

"Efectos del oncogén erbA en cultivos celulares de epitelio mamario y análisis de posibles mutaciones en adenocarcinomas de mama" (*08.1/0042/1998*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 1998-2000

"Regulación de receptores hormonales nucleares por co-represores transcripcionales" financiado por Acción Integrada con Alemania, Ministerio de Educación y Cultura. Años 1999-2000

"Utilización de quimiotecas combinatoriales para la identificación de inhibidores selectivos de semaforinas implicadas en regeneración axonal y cáncer" (*2FD97-1760-C03-02*) financiado por Programa FEDER, Plan Nacional I+D. Años 2000-2001

"Oncogén erbA/receptor de la hormona tiroidea: estudios funcionales de formas mutadas y relaciones con otros oncogenes". (*08.1/0069/2000 1*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2001-2002

"Biología de los receptores nucleares: regulación génica y cáncer. Mecanismo de acción de agentes antitumorales de origen marino" (*SAF01-2291*) financiado por Plan Nacional de I + D, Programa de Salud. Años 2001-2004

"Mecanismo de inhibición de la angiogénesis tumoral por trombospondina-1". IP: Benilde Jiménez Cuenca (*08.1/0010.1/2000*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2001-2002

"Mecanismo de acción antiangiogénica y antitumoral de TSP-1 y PEDF". IP: Benilde Jiménez Cuenca (*SAF-2001-1349*) financiado por Plan Nacional de I + D, Programa de Salud. Años 2001-2004

"Estudio del mecanismo de acción de agentes antitumorales de origen marino" financiado por Pharma Mar S.A.. Años 2000-2001

Estudio del mecanismo de acción antitumoral de la Aplidina y el Kahalalido F financiado por Pharma Mar S.A.. Años 2001-2004

Premios

Premio de Investigación Biomédica de la Fundación Francisco Cobos (2000)

Palabras Clave

Receptores nucleares, cáncer, angiogénesis, colon, mama, oncogén erbA, agentes antitumorales, cerebro, regulación génica, hormona tiroidea, hipotiroidismo

Regulación de las UCPs, leptina y desiodasas en adipocitos

Investigador principal	Obregón Perea, María Jesús, Investigador Científico
Investigadores	Escobar del Rey, Francisco
Asociados	Morreale de Castro, Gabriela
Investigadores	Elst , Janny van der
Visitantes	van der Heide, Daan (Holanda)
Becarios Postdoctorales	Martínez de Mena, Raquel Medina Gómez, M ^a Gema(desde abril 2001 hasta julio 2001)
Becarios Predoctorales	Medina Gómez, M ^a Gema(desde 1997 hasta abril 2001) Regidor Alvarez, Natalia
Personal de Apoyo	Navarro Palanca, María Asunción(desde mayo 2001 hasta diciembre 2001)
Colaboraciones	Hume, Robert (Dundee, Escocia) Visser, Theo (Rotterdam, Holanda) Darras, Veerle (Lovaina, Belgica) Giralt, Marta (Barcelona)

Lineas de Investigación

Regulación del gen de UCP-1.

(R. Martínez-de-Mena, E.M. Martín, R.M. Calvo, M.J. Obregón)

El BAT es un tejido involucrado en la termogénesis facultativa. El principal mecanismo de activación termogénica del tejido adiposo marrón (BAT) es la inducción de la UCP-1, proteína mitocondrial específica del BAT, que al desacoplar la fosforilación oxidativa produce calor. Hemos estudiado los procesos de activación adrenérgica de la UCP-1 en cultivos primarios de adipocitos marrones de rata procedentes de células precursoras que diferencian a adipocitos maduros y su regulación por varias hormonas.

El mRNA de UCP-1 se estimula por norepinefrina (NE) y la T3 es necesaria y potencia enormemente los efectos de la NE sobre el mRNA de UCP-1. Estos efectos son a nivel transcripcional y requieren síntesis de proteínas. La T3 estabiliza la vida media del mRNA de UCP-1. En ausencia de insulina, la T3 tiene un potente inductor de UCP-1. Se ha estudiado la modulación de la activación

adrenérgica del mRNA por insulina (R.M.M.). La insulina inhibe la estimulación del mRNA de UCP-1, tanto cuando se usa NE+T3 como T3. Se ha estudiado la participación de varias rutas de señalización. Se ha estudiado el efecto de los glucocorticoides (por sí mismos no modifican la expresión de UCP-1) sobre la estimulación adrenérgica del mRNA de UCP-1, observándose efectos bifásicos, dependiendo de la dosis empleada, día de diferenciación y tiempo de exposición a estas hormonas, siendo sus efectos estimuladores durante la diferenciación e inhibidores durante fases celulares más tempranas (R.M.M.), además de inhibir la proliferación celular.

Además se ha estudiado la activación del gen de la UCP-1 a nivel de su promotor génico. Utilizamos las construcciones del promotor de la UCP-1 subclonadas en el laboratorio, estudiando su regulación por T3, NE e insulina usando transfecciones transitorias en cultivos primarios de rata. La estimulación del “enhancer” TRE (-2493/-2253), ligado al promotor basal de la UCP-1, es máxima usando T3+NE en ausencia de insulina.

Los glucocorticoides por sí mismos tienen una acción inhibitoria de la activación transcripcional del promotor de UCP-1 en estadios celulares muy tempranos, y su acción es estimuladora durante la fase de diferenciación (E.M., R.C.).

Regulación de las UCPs en adipocitos marrones por T3, Triac, NE, leptina y TZD

(M.G. Medina, N. Regidor, M.J. Obregón)

En 1997 se clonaron una familia de proteínas homólogas a la UCP-1 (UCP-2 y UCP-3), con una alta expresión en distintos tejidos, que podrían estar involucradas en el gasto energético a nivel del músculo esquelético y otros órganos. Tras obtener sus cDNA por RT-PCR, hemos estudiado la regulación de sus mRNAs en cultivos primarios de adipocitos marrones. Observamos efectos estimuladores de la T3 y el Triac sobre el mRNA de UCP-2 en adipocitos marrones, tanto solos como conjuntamente con NE. El Triac es más potente que la T3 en la estimulación de UCP-2. La insulina tiene efectos inhibidores sobre estos estímulos. Todos estos agentes no modifican la vida media del mRNA de UCP-2 (más de 24 h), actuando a nivel transcripcional (G.M.).

También hemos estudiado la regulación del mRNA de UCP3 por T3 y Triac, sin encontrar diferencias entre ambos. Hemos comenzado estudios con las TZD, potentes inductores de UCP3 (N.R.).

Hemos comenzado estudios en los mismos cultivos sobre la regulación del mRNA de las UCPs por leptina, obteniendo resultados positivos sobre los mRNA de

UCP1 y UCP2 (G.M.). La inducción de UCP2 por leptina es dependiente de la dosis y tiempo de exposición a leptina.

El Triac: un potente agente termogénico en el tejido adiposo marrón

(M.G. Medina, A. Hernández, R.M. Calvo, M.J. Obregón)

Hemos continuado los estudios sobre el efecto del Triac, un metabolito natural de la T3 con función desconocida, en cultivos primarios de adipocitos marrones (G.M.), confirmándose que tiene mayor potencia termogénica que la T3 sobre el mRNA de UCP-1 e UCP-2, actuando a dosis muy bajas. Los estudios se han completado analizando el uptake celular y nuclear de Triac y T3 y cuantificando sus efectos sobre otros genes como las desiodasas (D2 y D3) y la LPL. Las acciones del Triac sobre estos genes indican mayor potencia termogénica del Triac en adipocitos marrones.

Estos estudios se han completado con estudios in vivo, usando ratas infundidas con dos dosis de Triac o T3 (R.C., G.M., M.J.O.), confirmándose la mayor potencia termogénica del Triac en BAT sobre UCP-1 y UCP2, pero no sobre UCP-3. Asimismo parece ser una acción específica del BAT, que no encontramos en otros tejidos como músculo, corazón o en hígado o riñón (sobre genes como la D1, enzima malica). Se ha determinado el status tiroideo obtenido tras la infusión de T3 y Triac. Ambos producen fuerte inhibición del TSH e hipotiroidismo tisular, aunque los efectos del Triac son menores que la inhibición por T3. Hemos validado el RIA para determinar las concentraciones de Triac en distintos tejidos de rata, tras purificación de los extractos tisulares.

Regulación de leptina en adipocitos. Efectos de las hormonas tiroideas, insulina y suero

(M.G. Medina, M.J. Obregón)

La leptina, producto del gen *ob*, regula el apetito a nivel hipotalámico y el balance energético y es segregada por los adipocitos. Sus niveles circulantes son proporcionales al % de grasa corporal.

Hemos estudiado la regulación de su secreción y expresión (mRNA) en adipocitos blancos y marrones en cultivo primario. La T3 y el Triac inhiben la secreción y mRNA de la leptina y para observar este efecto se requiere insulina. Los efectos inhibidores son mayores en presencia de Norepinefrina (NE) en adipocitos blancos, mientras que en marrones la NE atenúa el efecto inhibidor. El suero tiene también cierto efecto inhibidor (incluso cuando esta libre de hormonas tiroideas). La insulina es el principal estimulador de leptina a nivel de secreción y

transcripción, siendo sus efectos dosis- y tiempo-dependientes, y mas rapidos e importantes en adipocitos blancos que en marrones.

Regulación de la Desiodasa tipo 2 (D2) en adipocitos marrones

(R. Martinez-de-Mena, M.J. Obregón)

La T3 necesaria para la activación termogénica del BAT es producida localmente en el adipocito marrón por la 5' Desiodasa tipo II (D2). Hemos estudiado la regulación de dicha actividad D2 en cultivos primarios de adipocitos marrones, por ser necesaria para la actividad termogénica. La actividad D2 se estimula por NE, vía receptores β_3 adrenérgicos. La T3 se requiere y potencia enormemente la activación adrenérgica de la D2 y ésta acción es similar a la producida sobre el mRNA de UCP-1. El efecto de la T3+NE es mayor en células totalmente diferenciadas y no parece estar mediado por aumentos del cAMP.

Hemos estudiado el papel de la insulina, que parece necesaria para la actividad D2, siendo su efecto directo, y no mediado a través de IGFs. La activación requiere la via MAPK. Hemos analizado tambien la regulacion de su mRNA, analizado los efectos de la NE y T3 sobre el mRNA de la D2. La NE per se no estimula el mRNA de la D2 (RT-PCR), y para ser efectiva requiere la presencia de T3. La T3 per se, induce pequeños aumentos en el mRNA de D2. Hemos abordado el estudio de las rutas de señalización de la NE e insulina, via MAPK.

Los glucocorticoides ejercen una accion inhibidora de la actividad D2 a tiempos cortos y dosis altas, especialmente la Dexametasona, mientras que a tiempos largos y dosis pequeñas su accion puede ser estimuladora, especialmente en el caso de la corticosterona (R.M.M.)

Regulación de las actividades 5'Desiodasas y otros genes en tejidos de humanos y de rata

(G. Morreale de Escobar, M. Arufe, R. Lavado, M.J. Obregón, Hume, R.)

Se han proseguido estudios sobre la regulación de las actividades desiodasas en tejidos fetales y adultos de rata (situaciones de deficiencia de iodo) y en tejidos humanos (Proyecto UE) (Ver lineas de investigación Dra G. Morreale), asi como en otras situaciones que influyen el eje tiroideo, como la diabetes. Se citan brevemente las líneas de investigación y situaciones experimentales donde se ha explorado la regulación de las desiodasas D1, D2 y D3 por hormonas tiroideas o insulina:

1. Efecto de la deficiencia de iodo sobre las desiodasas cerebrales, hepáticas,placentarias, tiroideas e hipofisarias. En este modelo de deficiencia de

iodo se realizó un estudio completo del perfil de las desiodasas D1, D2 y D3 en varios tejidos. Efecto de la deficiencia en iodo sobre la actividad D2 durante el desarrollo de la cóclea y del oído interno durante la fase postnatal.

2. Estudio del transportador de iodo (NIS) en situaciones de deficiencia de iodo en tiroides fetales y en otros tejidos como placenta, útero... (ambas líneas en colaboración con el grupo de los Dres María Arufe, Rosalia Lavado y G. Morreale).

3. Efecto de la diabetes y del tratamiento con T4 sobre la desiodasa hepática D1 y relación con el IGF-I (en colaboración con el grupo de la Dra A.M. Pascual-Leone, Centro Mixto CSIC- Fac. Farmacia. Universidad Complutense). La diabetes tiene efectos distintos sobre las desiodasas e IGF-I en etapa neonatal y en adultos.

4. Estudio de la D2 y D3 en tejidos humanos (cerebros) durante la etapa fetal. Se ha comenzado un estudio en colaboración con el Dr. Hume (Escocia), explorando el desarrollo ontogénico de las desiodasas y iodotironinas durante el desarrollo fetal en humanos. Se observa un aumento de la T3 y T4 en ciertas áreas cerebrales, y una disminución de la actividad D3. Las actividades D2 y D3, así como las hormonas tiroideas, presentan desarrollo ontogénico y son muy específicas de cada área cerebral estudiada.

Publicaciones

Hernández, A., Obregón, M.J. (2000). Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *American J Physiol (Endocrinol. & Metab.)* . 278 E769-E777.

Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. (2000). Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia?. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* . 85 3975-3987.

Escobar del Rey, F., Bernal, J., Obregón, M.J., Escobar-Morreale, H., Morreale de Escobar, G. (2000). Fisiología del Tiroides. En: "Tratado de Endocrinología Básica y Clínica" . (Tresguerres JAF, Aguilar E, Devesa J, Moreno B (eds), eds.). Síntesis, Madrid, II, 48 pp. 1115-1158.

Alaez, C., Calvo, R.M., Obregón, M.J., Alvarez, C., Goya, L., Martín, M.A., Pascual-Leone, A.M. (2001). Influence of type II 5' deiodinase on TSH content in diabetic rats. *J Physiol. Biochem.* . 57 221-230.

Schröder-van der Elst, J.P., van der Heide, D., Kastelijjn, J., Rousset, B., Obregón, M.J. (2001). The expression of the sodium/iodide symporter is up-regulated in the thyroid of fetuses of iodine-deficient rats. *Endocrinology.* 142 3736-3741.

Tesis Doctoral

M^a Gema Medina Gómez

"Efectos termogénicos del Triac en adipocitos. Regulación de las UCPs y leptina". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2001. Director: María Jesús Obregón. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

"Prevención de la Obesidad. Función y regulación de las proteínas desacoplantes (UCPs) en la activación del gasto energético". (08.6/0030/1998) financiado por CAM. Años 1999-2000

"Bases moleculares de la Obesidad. Regulación de las proteínas desacoplantes (UCPs) y activación del gasto energético". (99/0813) financiado por FISS. Años 1999-2001

"Neurodevelopmental disorders in premature infants caused by thyroid hormone insufficiency. Molecular Basis for diagnosis and therapy". (QLRT-1999-30930) financiado por C.E.E.. Años 2000-2003

"Funcion tiroidea materna y fetal y desarrollo cerebral: Investigaciones experimentales y epidemiológicas". (99/0852) financiado por FISS. Años 1999-2001

Premios

Premio de la SEEN al Mejor Poster Basico, patrocinado por Novo Nordisk (Congreso SEEN, Salamanca) (2000)

Palabras Clave

Adipocitos, termogenesis, obesidad, leptina, UCPs, desiodasas, T4, T3, Triac

Mecanismo de transcripción y señalización implicados en el control de la diferenciación y proliferación celular tiroidea

Investigador principal	Santisteban Sanz, Pilar, INV Comision Serv.
Investigadores Contratados	García Jimenez, Custodia
Investigadores Visitantes	Toro Nozal, M ^a José Univ. Alcalá de Henares
Becarios Postdoctorales	García García, Bibian Costamagna , M ^a Eugenia
Becarios Predoctorales	Medina Sanabria, Diego Luis Dilla Quintero, Tatiana Cuesta Rojo, Isabel Rivas González, Marcos Cruz Sanz, Patricia Losada González, Alejandro
Personal de Apoyo	Seisedos Domínguez, M ^a Teresa
Estudiantes de Licenciatura	Terrados Aguado, Gloria
Colaboraciones	José Ramón Naranjo, CNB, CSIC Juan A Tovar, Hospital La Paz Kenneth S.Zaret Fox-Chase Cancer Center (USA) Juan A Velasco, CNIO

Lineas de Investigación

Regulación de la transcripción del gen del transportador de Iodo (NIS)

(B. García, M.E. Costamagna, P. Santisteban)

Los genes específicos de tiroides y marcadores del fenotipo tiroideo diferenciado son los genes Tiroglobulina (Tg), Tiroperoxidasa (TPO) y el transportador de Iodo (NIS), genes necesarios para la síntesis de las hormonas tiroideas. Estas son hormonas iodadas y por tanto es necesario que el yodo sea captado del medio externo por las células epiteliales tiroideas. Esto lo hace mediante la proteína NIS (Na⁺/I⁻ Symporter). La expresión de NIS está inducida por la hormona TSH vía principalmente cAMP. Sin embargo una serie de observaciones nos han llevado a pensar que la TSH en este sistema actúa además de por cAMP/PKA por mecanismos independientes que implicarían a proteínas intercambiadoras de

residuos de Guanina (Guanine Exchange Factor) como GEF-cAMP o Epac y de la pequeña GTPasa Rap-1 que inducirían su expresión. La función tiroidea está regulada además de por TSH, por otras hormonas como la insulina o factores de crecimiento como IGF-1, TGF β , etc. Estos factores de crecimiento no sólo controlan la proliferación celular sino también la expresión de los genes tiroideos. A este respecto hemos demostrado que ambos factores de crecimiento inhiben la expresión de NIS inducida por TSH. La inhibición de IGF-1 tiene lugar vía PI3K y estamos estudiando en detalle las proteínas "down-stream" de PI3K implicadas en el anterior mecanismo. En el caso de TGF β , los resultados más recientes implican la participación de las Smads (3/4) en el mecanismo inhibitorio. La mayoría de este trabajo se ha realizado a nivel de la transcripción de NIS. Para ello hemos clonado su promotor y hemos descrito los elementos de respuesta a hormonas implicados en la anterior regulación. El elemento de respuesta a cAMP es complejo y se sitúa a 2.800 pb en un elemento que actúa como enhancer y que se ha denominado NUE (NIS Upstream Enhancer). A este elemento se unen los factores de transcripción específicos de tejido TTF-1 y Pax-8, genes homeo- y paired-box respectivamente. Entre los sitios de unión de ambos factores existe un elemento CRE-like al que no se sabe que factores de transcripción se unen y que estamos actualmente investigando. De la misma forma estamos identificando los elementos de respuesta que regulan negativamente el promotor de NIS vía PI3K. Los primeros resultados sugieren la existencia de un elemento TG/ATTT descrito en los promotores regulados negativamente por insulina/IGF-1 y al que se uniría el factor forkhead FKHR. Actualmente estamos estudiando la participación de dicho factor en la regulación de NIS por IGF-1. Finalmente, hemos comenzado a elucidar el mecanismo por el que TGF β vía Smad3/4 regularía negativamente el promotor de NIS. Nuestra hipótesis de estudio es que exista un reclutamiento de los factores activadores de la transcripción de NIS (TTF-1 y/o Pax-8) por parte de las Smads.

Reordenamiento de cromatina y control transcripcional.

(I. Cuesta, C. García, P. Santisteban, en colaboración con K.S. Zaret)

El objetivo principal de este proyecto es el entendimiento de como factores de transcripción que se unen a secuencias específicas del DNA regulan la estructura de la cromatina, y por lo tanto controlan la capacidad transcripcional de sus genes diana. Este proyecto ha surgido como consecuencia de que el factor de transcripción TTF-2, principal regulador de los genes Tg y TPO, pertenezca a la familia de factores forkhead. Estos factores son estructuralmente similares a las histonas linker y se ha demostrado en el grupo del Dr. Zaret que tienen capacidad intrínseca de descompactar cromatina en ausencia de la maquinaria clásica de remodelación. Esta propiedad ha sido demostrada para el factor forkhead HNF-3 y

el enhancer del gen de la albúmina y nosotros estamos realizando un estudio similar con TTF-2 y el promotor de TPO. En primer lugar hemos realizado un mapeo detallado de las posiciones de los nucleosomas en el promotor de TPO y hemos analizado mediante footprinting genómico la unión in vivo de los factores de transcripción tiroideos (TTF-1, TTF-2 y Pax-8). Por ensayos de digestión a DNasaI y MNasa hemos demostrado la existencia de una partícula nucleosomal sobre el promotor activo de TPO in vivo. En ausencia de hormonas (en donde no hay expresión de TPO ni de TTF-2) el patrón de hipersensibilidad a DNasaI está alterado indicando cambios en la conformación de la cromatina. Estamos estudiando nuevas aproximaciones experimentales hemos comenzado a desarrollar un modelo in vitro de sistemas nucleosómicos (?Nucleosomal arrays?) cuya función es analizar la unión de factores de transcripción y remodelamiento de cromatina en sistemas purificados. Este trabajo está siendo realizado por I. Cuesta en el laboratorio del Dr. Zaret. Consiste en clonar a ambos lados de la secuencia mínima del promotor de TPO, que equivale a 2 partículas nucleosomales, 5 repeticiones en tandem de la secuencia posicionadora de nucleosomas 5SrRNA del erizo de mar. De esta manera se generan sistemas nucleosómicos ordenados, que posteriormente se incubarán con la histona linker H1 para generar la estructura altamente compacta de 30nm de cromatina, similar a la que se genera in vivo. Posteriormente estudiaremos en estos ?arrays? la capacidad de remodelar cromatina de los factores tiroideos con especial énfasis de TTF-2. Este proyecto es complicado en su ejecución pero de enorme interés para futuros estudios del papel de la cromatina en mecanismos de diferenciación y desarrollo del tiroides.

Papel del represor transcripcional DREAM .

(M. Rivas, P. Santisteban, en colaboración con J.R. Naranjo)

Dentro del contexto de la transcripción de los genes tiroideos, hay que añadir un nuevo factor de transcripción DREAM (Downstream Response Element Antagonist Modulator) clonado en el laboratorio del Dr. Naranjo, y cuya expresión es abundante en tiroides. Este factor unido al DNA actúa como represor y cuando se separa de su elemento DRE se produce un mecanismo de de-represión. Este mecanismo se induce por Ca⁺⁺ y cAMP, dos importantes vías de señalización en el tiroides. Hemos analizado el papel funcional de DREAM sobre el promotor del gen Tg habiendo identificado 2 secuencias DRE en el mismo, localizadas ?upstream?, y que solapan con los sitios de unión de los factores de transcripción tiroideos TTF-1 y Pax-8. Se han generado líneas celulares tiroideas sobre-expresando la forma silvestre de DREAM o formas mutadas en diferentes dominios de la proteína y estamos estudiando como afectan a la expresión de los genes tiroideos. El mecanismo de cómo DREAM reprime a Tg se está estudiando

por diferentes aproximaciones experimentales, transfecciones, ensayos de retardo y ensayos pull-down. Aunque aún no tenemos un mecanismo exacto, los datos sugieren que en la transcripción del gen de Tg interviene TTF-1, Pax-8 y DREAM por un mecanismo finamente coordinado por cAMP. Un estudio similar se está realizando con el gen NIS, ya que en el enhancer NUE (descrito en la sección 1) existen elementos DRE que también solapan con TTF-1, Pax-8, además de con el elemento CRE-like.

Transducción de señales y ciclo celular en células epiteliales tiroideas.

(D.L. Medina, M.J. Toro, P. Santisteban)

El tiroides está compuesto de dos tipos celulares bien diferenciados: células epiteliales (o foliculares), que expresan Tg, TPO y NIS y células parafoliculares que expresan calcitonina. Las células epiteliales son el componente mayoritario y su proliferación está regulada principalmente por la hormona TSH. En un trabajo previo describimos la existencia de un bucle de regulación autocrina en células FRTL-5, en el que participan la TSH y el inhibidor general de la proliferación somatostatina (SS). Profundizando en los mecanismos implicados en este proceso hemos demostrado que la TSH disminuye los niveles de p27kip1, aumenta la expresión HMG-CoA-Reductasa, el enzima limitante en la síntesis de colesterol y derivados isoprenoides, y aumenta la traslocación a la membrana de la proteína GTPasa RhoA. Asimismo incrementa la formación de los complejos ciclina E-CDK2 activos. Por el contrario la SS inhibe a todas estas proteínas y complejos. Hemos demostrado que la proliferación mediada por TSH se produce a través de dos vías en las que participan la PKA y la PI3K y que la SS bloquea estos efectos mucho más arriba de la activación de las vías de la PKA y la PI3K, inactivando la adenilato ciclasa. Dado que tanto los receptores de TSH como los de SS está acoplados a proteínas G heterotriméricas, estamos estudiando en detalle las subunidades de estas proteínas que median la acción de cada uno de los anteriores ligandos y como se acoplan las señales que inducen proliferación y/o diferenciación.

Papel de RhoA en el mecanismo de proliferación celular tiroidea.

(D.L. Medina, M. Rivas, P. Cruz, P. Santisteban)

Basándonos en nuestras observaciones de que TSH aumentaba la activación de RhoA y en la importancia de los genes Ras en tiroides, hemos estudiado el papel de RhoA en el programa de proliferación y diferenciación tiroidea. Para ello hemos generado células tiroideas expresando de manera estable el dominante positivo o el dominante negativo de RhoA. Los resultados obtenidos indican que la expresión de la forma activa de RhoA induce un cambio en la morfología de las

células tiroideas, con un fenotipo similar a fibroblastos. Se hacen independientes de mitógenos (TSH e IGF-1) para su crecimiento y la expresión de genes marcadores de diferenciación tiroidea esta disminuida. Además inducen tumores en ratones desnudos. En conclusión, RhoA induciría transformación en células epiteliales tiroidea.

Papel del inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (DARPP-32) en la vía de señalización dependiente de TSH/cAMP e IGF-1

(C. García, P. Santisteban)

En nuestro laboratorio hemos clonado e identificado en células tiroideas una proteína que ha resultado ser DARPP-32, un inhibidor de la PP1. Puesto que la fosforilación de proteínas es necesaria para el control de la proliferación y diferenciación en respuesta a TSH e IGF-1 hemos considerado interesante estudiar el papel de DARPP-32 en ambos mecanismos. Hemos demostrado que tanto TSH/cAMP como IGF-1 inducen la expresión de DARPP-32 (mRNA y proteína). Esta inducción ocurre en paralelo a la activación de fosfo-CREB, aunque las cinéticas de cada ligando es diferente. Queremos analizar si la expresión constitutiva de DARPP-32 puede suplir la carencia de estímulos hormonales y si ello va acompañado de la proliferación y/o un aumento de la expresión de los genes tiroideos Tg, TPO y NIS.

Papel del oncogén mdm2 en células de carcinoma medular de tiroides

(T. Dilla, G. Terrados, P. Santisteban, con la colaboración de J.A. Velasco)

En este estudio hemos utilizando un modelo de células parafoliculares derivadas de un carcinoma medular de tiroides (células MTT). Datos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que estas células son deficientes en p53 y mdm2. Por ello en este trabajo hemos analizado la participación de la oncoproteína MDM2 en el crecimiento y tumorigénesis. En primer lugar hemos demostrado que la sobre-expresión de mdm2 en esta línea celular induce apoptosis, fenómeno que desaparece tras la expresión de p53 y p19ARF. La expresión de mdm2 reduce la capacidad proliferativa de las células MTT en medio semisólido y la generación de tumores en ratones desnudos. Las proteínas implicadas en la apoptosis mediada por MDM2 son bcl-2 y caspasa 2. Hemos analizado también la respuesta a la radiación ionizante de las células MTT y la participación de MDM2, observando que la sobre-expresión de esta oncoproteína hace a las células más sensible a la radiación. Dado que los niveles de E2F-1 aumentan en las células que sobre-expresan mdm2, hemos estudiado el papel de este factor en los fenómenos de apoptosis y en la repuesta a la radiación ionizante. Se han generado líneas MTT

sobre-expresando E2F-1 y hemos demostrado que estas células también sufren un proceso de apoptosis y son más sensibles a la radiación.

Expresión de las proteínas surfactante de pulmón y del factor de transcripción homeótico TTF-1: Papel de glucocorticoides y antioxidantes

(M.T. Seisdedos Losada, A., P. Santisteban, en colaboración con J.A. Tovar)

El factor de transcripción homeótico TTF-1, se expresa además de en tiroides, en pulmón regulando las proteínas del surfactante pulmonar. Utilizando un modelo animal de hipoplasia pulmonar hemos demostrado que la expresión de este factor está disminuida. Esta disminución se revierte tras el tratamiento con glucocorticoides (Dexametasona-Dex). El modelo de hipoplasia pulmonar se induce con el herbicida Nitrofen (NF). Hemos estudiado en detalle el mecanismo por el que este compuesto induce la disminución de TTF-1 y el mecanismo molecular por el que los glucocorticoides revierten el efecto. En primer lugar hemos demostrado que el NF actúa en este sistema como un oxidante. Dado que TTF-1 se regula por un mecanismo Red-ox, está claro que el aumento del estado oxidativo de las células disminuye la unión de TTF-1 a su promotor. En paralelo Nitrofen induce un aumento en la expresión de tioredoxina, efecto que es revertido por dexametasona. Dado que en el promotor de TTF-1 no tiene elementos de respuesta a glucocorticoides, estamos trabajando con la hipótesis de que el mecanismo de acción sea a través de elementos AP1. De hecho el NF aumenta los niveles de Jun-fosforilado y de JNK efecto que es revertido con el tratamiento con Dex.

Publicaciones

Dilla, T. J. A Velasco, Medina, D.L., Medina, D.L. González-Palacios J.F., Santisteban, P. (2000). The MDM2 oncoprotein promotes apoptosis in p53-deficient human medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrinology*. 141 420-429.

Medina, D.L. Suzuki, K., Pietrarelli, M., Okajima, F., Kohn, L.D., Santisteban, P. (2000). Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and Pax-8 genes expression in FRTL-5 cells. *Thyroid*. 10 295-303.

Medina, D.L., Toro, M.J., Santisteban, P. (2000). Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by PKA and PI3-K: Involvement of RhoA and cyclin E-CDK2 complexes. *J Biol Chem*. 275 15549-15556d.

Losada, A., Tovar, J.A., Xia, H., Diéz-Pardo, J.A., Santisteban, P. (2000). Down regulation of TTF-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoid. . *Endocrinology*. 141 2166-2173.

Medina, D.L., Santisteban, P. (2000). Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems . *Eur J Endocrinol*. 143 161-178.

J.A. Velasco , Dilla, T., Santisteban, P. (2000). Opposite effects of p53 and mdm2 on the radiation response of human medullary thyroid carcinoma cells. En: *Proceedings of The Thyroid and Environment*. (Schattauer eds.). Merck European Thyroid Symposium, Budapest, pp. 358-359.

Mayayo, E , Santisteban, P., Vicens-Calvet, E (2000). Patología tiroidea fetal y neonatal . En: *Tratado de Endocrinología Pediática y de la Adolescencia* . (Argente J., Carrascosa A., Gracia, R. Rodríguez F. eds.). Doyma, Barcelona, pp. 647-700.

Tesis Doctoral

Diego Luis Medina Sanabria

"Definición de un nuevo mecanismo autocrino de control de la proliferación celular tiroidea por tirotropina y somatostatina: Señalización dependiente e independiente de PKA". Universidad Autónoma. Facultad de Ciencias Biológicas. 2000. Director: Pilar Santisteban. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Alejandro Losada González

"Inhibición de la expresión del factor de transcripción homeótico TTF-1 y su regulación por glucocorticoides en el modelo experimental de hipoplasia pulmonar". Universidad Autónoma. Facultad de Medicina. 2000. Director: Pilar Santisteban. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Efecto de la radiación como agente carcinogénico en el desarrollo del cáncer de tiroides (08.1/0025/97) financiado por CAM. Años 1998-2000

Regulación de la transcripción específica de tejido: Análisis de las señales implicadas en el control de la proliferación celular tiroidea. (PB 97-0065) financiado por DGICYT. Años 1998-2001

Nuevas terapias basadas en la expresión del gen del transportador de yodo en carcinomas tiroideos. (08.1/0025.1/99) financiado por CAM. Años 2000-2001

Papel de la estructura altamente ordenada de la cromatina en el control transcripcional. (200033) financiado por Programa Conjunto Hispano-Norteamericano de Cooperación Científica y Tecnológica. Años 2000-2001

Premios

Investigación en Patología Tiroidea. Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (2000)

Premio Sero de Investigación en Endocrinología Básica (2000)

Palabras Clave

Transcripción, Expresión génica, Factores de transcripción específicos de tejido, Represores transcripcionales, Cromatina, Transducción de señales, Diferenciación, Proliferación

Mecanismos transcripcionales de diferenciación celular

Investigador principal	Vallejo Fdez de la Reguera, Mario, Científico Titular
Becarios Predoctorales	Lakhwani Lakhwani, Sita Cebolla Garrofé, Beatriz Mirasierra Cuevas, Mercedes
Estudiantes de Licenciatura	Pascual Serrano, Fernando Gaytán de Ayala Alonso, Andrés

Lineas de Investigación

Diferenciación de astrocitos corticales durante el desarrollo embrionario

(B. Cebolla, M. Vallejo)

Observaciones realizadas en nuestro laboratorio indican que la estimulación de los sistemas de señalización intracelular dependientes de AMPc en células precursoras de la corteza cerebral embrionaria inducen su diferenciación en astrocitos, que se acompaña de una inhibición de la proliferación celular. Parte integral del proceso de diferenciación astrocítica es la activación de los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión del gen que codifica la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP; glial fibrillary acidic protein). Por este motivo hemos centrado una de nuestras líneas de investigación en el análisis funcional del promotor de este gen. Este análisis nos ha permitido caracterizar diversos elementos reguladores. Entre ellos, hemos localizado la ubicación de un elemento regulador que estimula la transcripción dependiente de AMPc. Este elemento se localiza en una zona próxima a la caja TATA, y su secuencia no guarda relación con las secuencias consenso de elementos de respuesta a AMPc descritas hasta ahora.

Regulación de la expresión génica por factores de transcripción tipo homeodominio en el sistema nervioso central

(S. Lakhwani, M. Mirasierra, M. Vallejo)

Por otro lado, estudiamos los mecanismos por los cuales dos factores de transcripción de tipo homeodominio, denominados Opx-1 y Drx-1, regulan procesos necesarios para el correcto desarrollo embrionario del sistema nervioso

central. Dentro de este tema nos centramos en la investigación de los mecanismos moleculares por los que Opx-1 y Drx-1 regulan la expresión del gen que codifica GFAP durante la diferenciación de astrocitos corticales. La expresión de GFAP en astrocitos es esencial para el mantenimiento de las funciones normales de los mismos, y su deterioro se relaciona etiopatogénicamente con la aparición de enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central. Por extensión, estudiamos la posible participación de Opx-1 en los mecanismos que controlan el cierre del tubo neural embrionario, cuyos defectos desencadenan alteraciones congénitas del desarrollo que aparecen clínicamente con relativa frecuencia.

Regulación transcripcional del gen de insulina en islotes pancreáticos

(M. Mirasierra, M. Vallejo)

En el transcurso de los estudios encaminados a caracterizar en qué tejidos se expresa Opx-1, encontramos que, además de estar presente en el sistema nervioso central, también se expresa en las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans. Ello nos dio pie a investigar si Opx-1 participa en la regulación de la transcripción del gen que codifica insulina. Nuestros estudios han revelado que Opx-1 reconoce el promotor de este gen a nivel de un elemento que se conoce como E2-A3/4. A este nivel, Opx-1 parece interactuar específicamente con otros factores de transcripción de tipo homeodominio y bHLH.

Publicaciones

Schwartz, P.T., Pérez-Villamil, B., Rivera, A. Moratalla, R., Vallejo, M. (2000). Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. *J. Biol. Chem.* 275 19106-19114.

Zulewski, H., Abraham, E.J., Moritza, W., Myller, B., Daniel, P.B., Vallejo, M., Thomas, M., Habener, J.F. (2001). Multipotential nestin-positive stem-cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes cells. *Diabetes.* 50 521-533.

Oliveira, L.M.B., Seminara, S.B., Beranova, M., Hayes, F.J., Valkenburg, S.B., Schipani, E., Costa, E.M.F., Latronico, A.C., Crowley, W.F., Vallejo, M. (2001). The importance of autosomal genes in Kalmann syndrome: Genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 1532-1538.

Beranova, M., Oliveira, L.M.B., Bedecarrats, G.Y., Schipani, E., Vallejo, M., Ammini, A.C., Quintos, J.B., Hall, J.E., Martin, K.A., Hayes, F.J., Pittlound, N., Kaiser, U., Crowley, W.F., Seminara, S. (2001). Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 1580-1588.

Vallejo, M. (2001). The structure and regulation of the somatostatin gene. En: *Somatostatin*. (Yogesh Patel eds.). Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA,

Financiación

Regulación neural de la expresión génica de somatostatina por factores de transcripción tipo homeodominio (*PB1998-1629-CO2*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología. Años 2000-2002

Palabras Clave

Diferenciación neural, homeodominios, AMPc, astrocitos, insulina

**Departamento de Enzimología y
Patología Molecular**

Bases moleculares del control del consumo de glucosa en eucariotes y evaluación no invasiva de la intolerancia a la lactosa con galactosil-xilosa.

Investigador principal	Aragón Reyes, Juan J., Catedrático UAM
Investigadores Asociados	Martínez-Costa Pérez, Oscar Hernan Profesor Asociado UAM
Investigadores Visitantes	Marina Losada, Pablo, Depto. Genética, Fac. Biología, Universidad de Sevilla
Becarios Postdoctorales	Santamaría Jiménez, M ^a Belén(2001)
Becarios Predoctorales	Santamaría Jiménez, M ^a Belén(2000) Hermida Diaz, Carmen Ferrerias Puente, Cristina Martín Alonso, Rosa Alicia
Personal de Apoyo	Sánchez López, Valentina Ayudante Diplomado de Investigación
Estudiantes de Licenciatura	Sanz Bartolomé, Ana Belén, estudiante Licenciatura de Bioquímica curso 2000-2001 Mazuelos Bellido, Francisco estudiante Licenciatura de Medicina (beca colaboración UAM 2000-2001) Lara Almunia, Mónica, estudiante de la Licenciatura de Medicina (2001) Gui-Youn Cho Lee, Iniciación a la Investigación Básica (2000) Hernández Diez, Antonio, Iniciación a la Investigación Básica (2000) Fresno Navacerrada, Gema, Iniciación a la Investigación Básica (2001)
Colaboraciones	Fernández Mayorales, Alfonso, Instituto de Química Orgánica, CSIC Romero, Antonio, CIB Gancedo Rodríguez, Carlos Escalante Hernández, Ricardo Codoceo Alquinta, Rosa, Laboratorio de Gastroenterología, Hospital La Paz López Calderón, Isabel, Depto. Genética, Fac. Biología, Universidad de Sevilla

Tornheim, Keith, Dept. Biochemistry, Boston University School of Medicine

Moitoso de Vargas, Lina, Dept. Medicine, Boston University School of Medicine

Lineas de Investigación

Relaciones estructura/función en el control alostérico de fosfofructoquinasas eucarióticas.

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

Estamos investigando los requerimientos estructurales que median los mecanismos de regulación y la función de la fosfofructoquinasa (PFK), enzima glicolítico considerado fundamental para el control del metabolismo energético y del que no se conoce aún su estructura tridimensional en células eucarióticas. Para ello recurrimos a la manipulación de la secuencia de diversas isoformas con propiedades reguladoras diferentes. Por un lado, estamos identificando aminoácidos implicados en la respuesta a ligantes específicos, tratando de distinguir entre su contribución al sitio de unión o a la transición alostérica, así como a los cambios en estructura cuaternaria que median este tipo de transiciones. La manipulación del enzima no alostérico de *Dictyostelium discoideum* (DdPFK) nos llevó a identificar a su extensión C-terminal como responsable de esa conducta; mediante análisis sistemático de esta región hemos encontrado que el último residuo C-terminal, Leu⁸³⁴, es crítico en este sentido, bastando su delección o sustitución para generar un enzima alostérico (B. Santamaría, A. M. Estévez, O. H. Martínez-Costa and J. J. Aragón. *J. Biol. Chem.* 277, 1210-1216, 2002. Publicado como *JBC papers On Line*, November 7, 2001). Este estudio ha suministrado además una nueva interpretación del control alostérico de PFK. Dentro de esta línea estamos trabajando también (en colaboración con C. Gancedo) en la caracterización y el clonaje de enzimas glicolíticos de la levadura no convencional *Yarrowia lipolytica* que presentan diferencias importantes en el control de esta vía. Tratamos de complementar estos estudios con la cristalización (en colaboración con A. Romero del CIB) de diversas formas de PFKs eucarióticas incluyendo algunos mutantes alostéricos de DdPFK, con objeto de resolver su estructura tridimensional.

Interacción de enzimas glicolíticos con la formación de microtúbulos.

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

Es conocido que algunos enzimas glicolíticos interaccionan con tubulina y microtúbulos inhibiéndose su actividad. Nosotros encontramos que DdPFK es un

potente inhibidor de la polimerización de tubulina sin afectarse su actividad catalítica. Mediante alineamientos con la secuencia de la oncoproteína 18/estatmina (inhibidor in vivo de la dinámica de microtúbulos) hemos identificado residuos en DdPFK cuya sustitución reduce marcadamente el efecto inhibidor del enzima salvaje. La sobreexpresión del gen *pfk* en *Dictyostelium* disminuye substancialmente el crecimiento de este organismo, cuya posible relación con la inhibición de la formación de microtúbulos estamos investigando. La generación de un mutante nulo para este gen por recombinación homóloga sugiere que el knock-out sea letal, lo que nos planteamos investigar con otros abordajes alternativos de anulación de su expresión (en colaboración con R. Escalante).

Evaluación in vivo de lactasa intestinal con galactosil-xilosa como prueba diagnóstica no invasiva para la intolerancia a la lactosa.

(C. Hermida y J.J. Aragón)

Hemos optimizado la valoración in vivo de la actividad lactasa intestinal mediante la medida de xilosa en plasma tras la administración oral de 4-galactosil-xilosa a ratas lactantes, como sistema alternativo a la valoración de la pentosa en orina. Los niveles de xilosa en plasma se correlacionan fuertemente con la actividad lactasa en mucosa intestinal a lo largo del desarrollo, por lo que esta metodología es igualmente válida, bastando con un volumen mínimo de sangre y podría ser de interés especial en clínica pediátrica. Por otro lado, utilizando inhibidores específicos del sitio lactasa, hemos evaluado in vivo e in vitro la contribución de este sitio y del sitio florizin hidrolasa de la lactasa a la hidrólisis de 4-galactosil-xilosa frente a los regioisómeros 3- y 2- galactosil-xilosas (sintetizados en el laboratorio de A. Fernández-Mayoralas) para los que el enzima tiene diferente eficacia catalítica. Todas las pruebas toxicológicas que se han realizado hasta ahora con 4-galactosil-xilosa han resultado negativas. Un ensayo piloto con voluntarios adultos nos ha mostrado que esta metodología es apta para el diagnóstico no invasivo de la deficiencia de lactasa en humanos (intolerancia a la lactosa) y estamos procediendo a su optimización.

Análisis genético-molecular de la deficiencia del transporte intestinal de monosacáridos.

(R.A. Martín, O. Martínez-Costa y J.J. Aragón)

La deficiencia congénita del cotransporte de glucosa y galactosa con Na⁺ a nivel de la mucosa del intestino delgado origina mala absorción severa para estos azúcares en el recién nacido. Esta enfermedad es poco frecuente y su diagnóstico se apoya en la determinación de glucemia e hidrógeno expirado tras

administración oral de glucosa. De entre los transportadores de azúcares en intestino delgado dependientes de Na^+ , SGLT1 es el de mayor importancia y en el que se han identificado mutaciones responsables del cuadro clínico. En colaboración con R. Codoceo del Laboratorio de Gastroenterología del Hospital La Paz, estamos tratando de aislar los presuntos genes alterados en varias familias portadores de esta patología y analizar el valor funcional de los cambios de secuencia que puedan detectarse.

Estudio estructural de la aspartato kinasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

(P. Marinas, O. Martínez-Costa y J.J. Aragón)

La aspartato kinasa cataliza la etapa clave en la regulación de la síntesis de treonina en *S. cerevisiae* mediante retroinhibición por ese aminoácido. En colaboración con el laboratorio de I. L. Calderón del Depto. de Genética de la Universidad de Sevilla, estamos interesados en estudiar la estructura cuaternaria de este enzima y de formas mutantes a partir de cepas hiperproductoras de treonina insensibles a la retroinhibición, para investigar el posible papel que la formación de oligómeros puede tener en los cambios de actividad del enzima.

Publicaciones

Sánchez-Martínez, C., Estévez, A.M and Aragón, J.J. (2000). The phosphofructokinase C isozyme from ascites tumor cells: cloning, expression and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 635-640.

Tesis Doctoral

M^a Belén Santamaría Jiménez

"Conversión de la fosfofructokinasa no alostérica de *Dictyostelium discoideum* en un enzima alostérico e inhibición de la polimerización de tubulina por el enzima nativo". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 2001. Director: Juan José Aragón. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Análisis estructural del control, expresión e interacción con la formación de microtúbulos de fosfofructokinatas eucarióticas (*PB98-0058*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Años 1999-2002

Análisis funcional de la fosfofructokinasa de *Dictyostelium discoideum* como un nuevo inhibidor de la formación de microtúbulos (07B/0011/1999) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 2000-2000

Patentes

Un procedimiento enzimático para obtener 4-0- b-D-galactopiranosil-D-xilosa, 4-0-b-D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida de acuerdo con el procedimiento, composiciones que la contienen y su uso en la evaluación de la lactasa intestinal N° de solicitud: 200101419. España 2001-07-18. CSIC-UAM

Palabras Clave

fosfofructokinasa, relaciones estructura/función, regulación metabólica, glicolisis, tubulina, microtúbulos, lactasa intestinal, intolerancia a la lactosa, transporte intestinal de glucosa/galactosa, aspartato kinasa, *Dictyostelium discoideum*, levaduras

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

Investigador principal Fernández de Heredia, Claudio, Dr. Ad Honorem
Personal de Apoyo Navarro Palanca, María Asunción

Lineas de Investigación

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

(F.de Heredia ,Claudio , M.A. Navarro)

Hemos continuado el trabajo sobre secreción de glucosa por levadura fermentando maltosa, como respuesta a la presencia de hexosas en el medio, realizando principalmente un estudio de la cinética y características de inactivación/reactivación de un factor protéico implicado en el proceso.

Publicaciones

Fernández-Centeno Elena , F de Heredia, Claudio (2000). 2',3'Cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase from *Fusarium culmorum*. *Comp. Biochem Physiol. PartB.* 125 161-167.

Palabras Clave

Carbohidratos, *Saccharomyces*

Metabolismo y función de los dinucleósido polifosfatos

Investigador principal	Günther Nonell, María Antonia, Investigador Científico
Investigadores Asociados	Sillero Repullo, Antonio Catedrático, UAM
Becarios Predoctorales	Atencia Fernández, Eva Ana(desde enero 2000 hasta julio 2000) Carvalho Pinheiro Osório, Hugo A. (desde 2001)
Personal de Apoyo	Diego Erasun, Isabel(desde noviembre 1987) Hélène Soledade, Moniz(desde junio 2000 hasta julio 2000) Hélène Soledade, Moniz(desde febrero 2001 hasta marzo 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Socorro da C. Freitas, Sonia María(desde febrero 2000 hasta julio 2000) Baptista Gomes, Maria Joao(desde 2000 hasta abril 2000) Barros de Carvalho, Elisabete(desde febrero 2001 hasta julio 2001) Oliveira , Jorge Miguel de(desde 2000 hasta abril 2000) Herranz Fernandez, Silvia(desde 2000 hasta junio 2000)

Lineas de Investigación

Síntesis y modificación de (di)nucleósido polifosfatos

(M.A. Günther, E.A. Atencia, S.M. Socorro da C., R. Fortes, I. Diego, M.J. Baptista, A. Sillero)

Los dinucleósido polifosfatos parecen tener funciones importantes de señalización tanto dentro como fuera de la célula. Su concentración intracelular viene determinada por su velocidad de síntesis y degradación. En los últimos años nuestro grupo se ha dedicado principalmente a conocer nuevas vías de síntesis de estos compuestos. Durante esta investigación se ha visto, que la T4 RNA ligasa, enzima que cataliza reacciones inter- o intramoleculares con formación de enlaces fosfodiéster en el RNA o DNA, es capaz de catalizar la síntesis de dinucleósido polifosfatos; estos compuestos se comportan además como análogos de RNA al aceptar en la posición 3'-OH el grupo citidina 3',5'-bisfosfato. Estudios con la poli(A) polimerasa de E.coli, han revelado que este enzima además de añadir

colas de poli(A) al RNA, es capaz de adenilar los residuos 3'-hidroxilo de nucleósidos, nucleósidos 5'-fosfatos y dinucleósido polifosfatos. Este último encuentro puede tener significado fisiológico puesto que concentraciones milimolares de nucleósidos/nucleótidos podrían competir in vivo con la poliadenilación del RNA

Aspectos teóricos del metabolismo de nucleótidos purínicos

(M.A. Torrecilla, H.A. Carvalho Pinhei, J.M.d. Oliveira, M.A. Günther, A. Sillero)

Para este tipo de trabajo hay que establecer en primer lugar la ecuación de velocidad, para cada enzima que interviene en el metabolismo objeto de estudio, y tener en cuenta sus constantes cinéticas y la influencia de posibles efectores. Seguidamente se escriben las ecuaciones diferenciales que describen los cambios en la concentración de sustratos y productos intermediarios en función del tiempo. Estas ecuaciones se solventan con ayuda del programa Mathematica 3.0. Mediante este método se pueden simular situaciones no factibles de ser estudiadas in vitro, y permite asimismo, conocida la concentración de los metabolitos en determinadas situaciones (estrés por ejemplo), analizar las vías metabólicas más afectadas. Este método se ha aplicado al estudio del metabolismo de los nucleótidos purínicos en el citosol de cerebro de rata

Publicaciones

Atencia, E.A., Montes, M., Günther, M.A., Sillero, A. (2000). Several dinucleoside polyphosphates are acceptor substrates in the T4 RNA ligase catalyzed reaction. *Eur. J. Biochem.* 267 1707-1714.

Sillero, A., Günther, M.A. (2000). ..Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases. *Pharma Theurapeut.* 87 91-102.

Torrecilla, M.A. Marques, A.F.P., Buscalioni, R.D., Oliveira, J.M.d., Teixeira, N.A., Atencia, E.A., Günther, M.A., Sillero, A. (2000). Metabolic fate of AMP, IMP, GMP and XMP in the cytosol of rat brain: an experimental and theoretical analysis. *J. Neurochem.* 76 1291-1307.

Günther, M.A., Socorro da C., S.M., Baptista, M.J., Valle, M.d., Diego, I., Sillero, A. (2001). Poly(A) polymerase from *E.coli* adenylates the 3'-hydroxyl residue of nucleosides, nucleoside 5'-phosphates and nucleoside (5') oligophospho (5') nucleosides (NpnN). *Eur. J. Biochem.* 268 3605-3611.

Tesis Doctoral

M^a Amparo Torrecilla Rojas

"Metabolismo de nucleótidos purínicos en el citosol de hígado y cerebro de rata. Desarrollo y aplicación de un modelo teórico". Universidad Autónoma de Madrid... Facultad de Medicina.... 2000. Director: María Antonia Günther. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Eva Ana Atencia Fernández

"Los dinucleósido polifosfatos son sintetizados, y se comportan como aceptores, en la reacción catalizada por T4 RNA ligasa". Universidad Autónoma de Madrid.... Facultad de Medicina.... 2000. Director: María Antonia Günther. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por la DNA ligasa del bacteriófago T4 (08.9/0004/1998) financiado por CEYC Comunidad de Madrid. Años 1999-2000

Papel de las DNA y RNA ligasas en la síntesis de dinucleósido polifosfatos (PM98-0129) financiado por DGESEIC. Años 1999-2002

Premios

Premio Extraordinario tesis E.A.Atencia (2001)

Premio San Nicolás tesis E.A.Atencia (2001)

Palabras Clave

dinucleósido polifosfatos, nucleótidos purínicos, T4 RNA ligasa, poli(A) polimerasa

Mecanismos de resistencia celular a antifolatos : Evaluación de nuevos inhibidores de FPGS como posibles agentes antitumorales

Investigador principal	Llorente Rodríguez, Pilar, Investigador Científico
Investigadores Asociados	Montero Alvarez, Celia Profesor asociado (desde 2001) Rivera, Pilar. IIB de Barcelona Grau, Rosa. IIB de Barcelona
Personal de Apoyo	Argomaniz Lizondo, Luisa María
Colaboraciones	Arán, Vicente. Inst. Química Médica CSIC

Lineas de Investigación

Evaluación de nuevos inhibidores de FPGS y estudios de su interacción con otros enzimas dependientes de folatos

(Llorente Rodriguez ,Pilar)

La resistencia adquirida a MTX y a otros análogos de folato utilizados como antineoplásicos continua siendo la principal limitación de su efectividad clínica .Uno de los determinantes en la citotoxicidad ejercida por estas drgas es el proceso de síntesis intracelular de poliglutamilación mediada porla enzima FPGS. Se pretende diseñar nuevas combinaciones de productos capaces de revertir la resistencia de cánceres de páncreas ,colon y mama a antifolatos y MDR . Los fármacos se combinarán con nuevos productos de síntesis de inhibidores de la FPGS .. El objetivo es la evaluación de las características bioquímicas , acción sobre el metabolismo de folatos y actividad antitumoral de nuevos inhibidores de la FPGS, derivados de pterinas no conjugadas , que no se poliglutamilan y entran en la célula a través de la vía de transporte de pteridinas . Se pretende el diseño racional de nuevas modalidades de quimioterapia combinada para conseguir un efecto selectivo y sinérgico sobre células tumorales y reducir la toxicidad sistémica . Se estudiará la interacción de los productos con FPGS y otros enzimas dependientes de folatos in vitro y a nivel celular ; su acción sobre las vías de transporte de folatos ; su actividad citotóxica in vitro y su actividad antitumoral y roxicidad in vivo y distintas pautas de combinación de los inhibidores de la FPGS con inhibidores de otros enzimas dependientes de folatos .Los estudios se realizaran en líneas celulares humanas : carcinomas de páncreas (PANC-1 y BxPC-3) ,colon (HT 29) y mama (MCF 7). Líneas de tumores marinos que crecen in vivo e in vitro : LLA L5178 Y y sublíneas con distinto fenotipo de

resistencia a antifolatos , así como cultivos de células normales para descartar un efecto tóxico e inespecífico.

Metabolismo y función de dinucleósido polifosfatos

Investigador principal	Sillero Repullo, Antonio, Catedrático UAM
Investigadores Asociados	Günther Nonell, María Antonia Investigador
Becarios Predoctorales	Atencia Fernández, Eva Ana Carvalho Pinheiro Osório, Hugo Alexandre (desde 2001)
Personal de Apoyo	Diego Erasun, Isabel(desde noviembre 1987) Hélène Soledade, Moniz(desde junio 2000 hasta julio 2000) Hélène Soledade, Moniz(desde febrero 2001 hasta marzo 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Socorro da C. Freitas, Sonia María(desde febrero 2000 hasta julio 2000) Baptista Gomes, Maria Joao Barros de Carvalho, Elisabete Oliveira , Jorge Miguel de Herranz Fernandez, Silvia
Colaboraciones	J.N.Meireles Ribeiro

Lineas de Investigación

Síntesis de (di)nucleósido polifosfatos

(E.A. Atencia, M.J. Baptista, I. Diego, R.Fontes , S.M. Socorro da C., M.A. Günther, A. Sillero)

Los dinucleósido polifosfatos parecen tener funciones importantes de señalización tanto dentro como fuera de la célula. Su concentración intracelular viene determinada por su velocidad de síntesis y degradación. En los últimos años nuestro grupo se ha dedicado principalmente a conocer nuevas vías de síntesis de estos compuestos. Durante esta investigación se ha visto, que la T4 RNA ligasa, enzima que cataliza reacciones inter- o intramoleculares con formación de enlaces fosfodiéster en el RNA o DNA, es capaz de catalizar la síntesis de dinucleósido polifosfatos; estos compuestos se comportan además como análogos de RNA al aceptar en la posición 3'-OH el grupo citidina 3',5'-bisfosfato. Estudios con la Poli(A) polimerasa de E.coli, han revelado que este enzima además de añadir colas de poli(A) al RNA, es capaz de adenilar los residuos 3'-hidroxilo de nucleósidos, nucleósido 5'-fosfatos y dinucleósido polifosfatos. Este último encuentro puede tener significado fisiológico puesto que concentraciones

milimolares de nucleósidos/nucleótidos podrían competir in vivo con la poliadenilación del RNA

Aspectos teóricos del metabolismo de nucleótidos purínicos

(M.A. Torrecilla, J.M.d. Oliveira, Carvalho Pinheiro Osorio, Hugo A., E. Barros , M.A. Günther, A. Sillero)

Para este tipo de trabajo hay que establecer en primer lugar la ecuación de velocidad, para cada enzima que interviene en el metabolismo objeto de estudio, y tener en cuenta sus constantes cinéticas y la influencia de posibles efectores. Seguidamente se escriben las ecuaciones diferenciales que describen los cambios en la concentración de sustratos y productos intermediarios en función del tiempo. Estas ecuaciones se solventan con ayuda del programa Mathematica 3.0. Mediante este método se pueden simular situaciones no factibles de ser estudiadas in vitro, y permite asimismo, conocida la concentración de los metabolitos en determinadas situaciones (estrés por ejemplo), analizar las vías metabólicas más afectadas. Este método se ha aplicado al estudio del metabolismo de los nucleótidos purínicos en el citosol de cerebro de rata.

Cinética enzimática: aspectos teóricos

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

Se ha desarrollado un análisis conjunto de la activación e inhibición enzimática basados en una suposición de cinética de equilibrio rápido en la que una molécula de enzima liga una molécula de sustrato y una molécula de modificador. El modificador puede actuar como activador (esencial o no esencial), efecto sobre la velocidad de la reacción, dependiendo de los valores de las constantes de equilibrio, las constantes de velocidad y la concentración de sustrato. Se ha prestado una atención especial al análisis del punto de cruce de las líneas rectas de la representación de Lineweaver-Burk. Como consecuencia de este estudio se ha elaborado un método simple para transformar el cociente de dos polinomios de primer grado en una ecuación del tipo de Michaelis-Menten

Publicaciones

Atencia, E.A., Montes, M , Günther, M.A., Sillero, A. (2000). Several dinucleoside polyphosphates are acceptor substrates in the T4 RNA ligase catalyzed reaction. *Eur. J. Biochem.* 267 1707-1714.

Sillero, A., Günther, M.A. (2000). Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases. *Pharma. Therapeut.* 87 91-102.

Fontes, R., Ribeiro, J.M., Sillero, A (2000). Inhibition and activation of enzymes. The effect of a modifier on the reaction rate and on kinetic parameters. *Acta Biochim. Pol.* 47 233-257.

Fontes, R., Ribeiro, J.M., Sillero, A. (2000). An easy procedure to transform the ratio of two polynomials of first degree into Michaelis-Menten type equations. Application to the ordered uni-bi enzyme mechanism. *Acta Biochim. Pol.* 47 259-268.

Torrecilla, M.A., Marques, A.F.P., Buscalioni, R.D., Oliveira, J.M.d., Teixeira, N.A., Atencia, E.A., Günther, M.A., Sillero, A. (2001). Metabolic fate of AMP, IMP, GMP and XMP in the cytosol of rat brain: an experimental and theoretical analysis. *J. Neurochem.* 76 1291-1307.

Günther, M.A., Socorro da C., S.M., Baptista, M.J., Valle, M.d., Diego, I., Sillero, A. (2001). Poly(A) polymerase from *E.coli* adenylates the 3'-hydroxyl residue of nucleosides, nucleoside 5'-phosphates and nucleoside (5') oligophospho (5') nucleosides (NpnN). *Eur. J. Biochem.* 268 3605-3611.

McLennan, A.G., Barnes, L.D., Blackburn, G.M., Brenner, Ch., Guranowski, A., Miller, A.D., Rovira, J.M., Rotllán, O., Soria, B., Tanner, J.A., Sillero, A. (2001). Recent developments in the study of the intracellular function of diadenosine polyphosphates. *Drug Development Research.* 52 249-259.

Tesis Doctoral

Rui Fortes

"Síntese enzimica de mono e dinucleosídeos polifosfatados". Universidad de Porto (Portugal). Facultad de Medicina.... 2000. Director: Antonio Sillero. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

M^a Amparo Torrecilla Rojas

"Metabolismo de nucleótidos purínicos en el citosol de hígado y cerebro de rata. Desarrollo y aplicación de un modelo teórico". Universidad Autónoma de Madrid... Facultad de Medicina.... 2000. Director: Antonio Sillero. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Eva Ana Atencia Fernández

"Los dinucleósido polifosfatos son sintetizados, y se comportan como aceptores, en la reacción catalizada por T4RNA ligasa". Universidad .Autónoma de Madrid... Facultad de .Madrid... 2000. Director: Antonio Sillero. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Síntesis de dinucleósido polifosfatos catalizada por la DNA ligasa del bacteriófago T4 (08.9/0004/1998) financiado por CEYC Comunidad de Madrid. Años 1999-2000

Papel de las DNA y RNA ligasas en la síntesis de dinucleósido polifosfatos (PM98-0129) financiado por DGESEIC. Años 1999-2002

Premios

Premio extraordinario tesis E.A.Atencia (2001)

Premio San Nicolás tesis E.A.Atencia (2001)

Palabras Clave

dinucleósido polifosfatos, nucleótidos purínicos, T4 RNA ligasa, poli(A) polimerasa

**Departamento de Estructura y
Función de Biomoléculas**

Cot quinasa en la activación de linfocitos T

Investigador principal	Alemanya de la Peña, Susana, Científico Titular
Becarios Postdoctorales	Hernando Raquel (hasta 2001)
Becarios Predoctorales	Velasco-Sampayo, Ana de Gregorio Rosa Gandara Maria Luisa
Personal de Apoyo	Vicente Joaquin
Becarios FINNOVA	Gonzalez Cristina
Colaboraciones	Fresno Manuel Jose Gonzalez Castaño Philip Cohen

Lineas de Investigación

Estudio de la expresión de genes por Cot quinasa

(de Gregorio Rosa , Velasco-Sampayo, Ana)

Dentro de esta línea de investigación que llevamos en el laboratorio, en los años 2000-2001 hemos estudiado la regulación del gen ciclooxigenasa 2, implicado recientemente en angiogénesis, por la forma oncogénica y proto-oncogénica de Cot. Tambien nos hemos estudiado la regulación de expresión de genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular por Cot quinasa.

Estudio del gen Cot quinasa

(de Gregorio Rosa)

Dentro del la línea de estudio del gen Cot, en estos dos últimos años terminado de identificar la zona promotora y los elementos de respuesta de la misma implicados en la regulación transcripcional del gen por señales que activan al linfocito T.

Estudio de la actividad quinasa de la proteína proto-oncogénica y oncogénica Cot

(Gándara, Maria Luisa , Hernando, Raquel)

En el año 2000 comenzamos a estudiar las bases moleculares por las cuales la forma oncogénica de Cot tiene mayor poder transformante que la forma proto-oncogénica.

Publicaciones

Sanchez-Gongora, E , Lisbona, C , de Gregorio, R , Ballester, A , Calvo, V , Perez-Jurado, L , Alemany, S (2000). COT kinase proto-oncogene expression in T cells: Implication of the JNK/SAPK signal transduction pathway in COT promoter activation. *J.Biol.Chem.* 275 31379-31386.

Velasco-Sampayo, A , Alemany S (2001). p27Kip protein levels and E2F activity are targets of Cot kinase during G1 phase progression in T cells. *J.Immunol.* 166 6084-6090.

de Gregorio, R , Iñiguez, M.A., Fresno, M , Alemany, S (2001). Cot Kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J.Biol.Chem.* 276 27003-27009.

Tesis Doctoral

Ana Velasco Sampayo

"Implicación de Cot quinasa en la transición G1/S de células T ". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias . 2001. Director: Susana Alemany. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Activación y función de COT/Tpl-2 quinasa en la activación de linfocitos T (SAF99-0067) financiado por Plan Nacional. Años 1999-2002

Palabras Clave

Cot/tpl-2 quinasa, proto-oncogen, expresión génica, linfocitos, Map quinasa quinasa quinasa

Mecanismos moleculares de control de re-replicación: endomitosis megacariocítica.

Investigador principal	Calés Bourdet, Carmela, Profesor Titular UAM
Investigadores	Vilaboa Diaz, Nuria(desde 2000 hasta septiembre 2000)
Contratados	Ballester Jareño, Alicia(desde octubre 2000 hasta 2000)
Becarios Postdoctorales	Ballester Jareño, Alicia(desde octubre 1997 hasta septiembre 2000) Vilaboa Diaz, Nuria(desde octubre 2000 hasta enero 2002)
Becarios Predoctorales	Pérez Capilla, Tatiana(desde octubre 1998 hasta 2000) Rico Sánchez, Laura(desde octubre 1999 hasta junio 2001) Bermejo Moreno, Rodrigo(desde septiembre 2000)
Estudiantes de Licenciatura	Macías Oliva, Fernando(desde octubre 1999 hasta junio 2000) Sanjuan Sanz, Pilar (desde octubre 2000 hasta julio 2001)
Colaboraciones	Jonathan Frampton (desde 1996 hasta 2000) Rafael Bornstein (desde 1998)

Lineas de Investigación

Complejos ciclinas-cdk implicados en establecimiento ciclos endomitóticos

(C. Calés, T. Pérez, L. Rico)

En las células eucarióticas, la transición por las diferentes fases del ciclo celular está gobernada por la actuación de los diferentes complejos ciclinas-cdks, cuya actividad se manifiesta específicamente en las diferentes fases y/o transiciones de una fase a otra. Los dos eventos operativos, esto es, replicación del DNA (fase S) y división celular (fase M), están íntimamente interrelacionados, de tal manera que hasta que no se completa uno de ellos, no se puede iniciar el otro, para así conseguir mantener íntegra la dotación genómica de la progenie. En mamíferos, uno de los singulares tipos celulares que eluden el control de re-replicación es el megacariocito, el cual, en las últimas etapas de su diferenciación, establece ciclos de endoreplicación, dando lugar a una célula poliploide. El trabajo realizado en esta línea nos ha permitido definir los requerimientos básicos para que se produzca la poliploidización del megacariocito. Así, hemos mostrado que la endoreplicación de células megacarioblásticas HEL y MEG01 provocada por estimulación con ésteres de forbol (TPA) se acompaña del mantenimiento de

niveles de las ciclinas de G1/S E y A, al tiempo que se observa una depleción del regulador mitótico *cdc25C*. Además, hemos demostrado que la expresión sostenida de ciclina E determina el establecimiento de ciclos de endoreplicación en las células K562 (que diferencian hacia formas maduras megacariocíticas, pero no endorepican cuando son tratadas con TPA), a través de la activación directa de la expresión de ciclina A.1. Finalmente, hemos observado que la expresión de inhibidores de los complejos ciclinas-cdk, *p21cip1* y *p27kip1* se regula diferencialmente durante el establecimiento de la endoreplicación, si bien el papel que juegan cada uno de ellos es diferente. Si bien *p21cip1* parece estar implicado en el proceso general de diferenciación, la disminución de los niveles de *p27kip1* parece ser requisito indispensable para que la célula pueda iniciar ciclos endomitóticos. Este trabajo ha sido la base de desarrollo del laboratorio, y de estas observaciones primarias se han derivado diferentes líneas de actuación.

Regulación transcripcional de la endomitosis

(C. Calés, A. Ballester, N. Vilaboa, J. Frampton)

Nos hemos preguntado si el control último sobre la expresión diferencial de los factores del ciclo celular se produce a través de reguladores transcripcionales involucrados en el programa de diferenciación megacariocítica. Por analogía con otros sistemas celulares en los cuales se establecen ciclos de endoreplicación (células embrionarias y larvarias de *Drosophila*, o trofoblasto de ratón) quisimos investigar si *escargot*, un represor transcripcional de la familia *snail* de factores con dedos de Zn, tenía un papel activo en el establecimiento de los ciclos endomitóticos de los megacariocitos. Para ello, se aislaron transfectantes estables que expresaban de manera constitutiva el cDNA de *escargot*. El análisis de estas líneas celulares nos ha permitido concluir que *escargot* interfiere con el programa transcripcional inducido por el estímulo diferenciador, lo que resulta en la inhibición de la entrada en ciclos endomitóticos. Asimismo, hemos podido establecer la presencia de proteínas nucleares endógenas con capacidad de unión a las secuencias consenso de la familia *snail* y cuya expresión diferencial en células megacariocíticas, incapaces de endoreplicar, pone de manifiesto la presencia de factores endógenos cuya función puede ser análoga a la del *escargot* ectópico. En la actualidad seguimos explorando la naturaleza de estas proteínas nucleares, sus posibles dianas y su imbricación en el programa transcripcional megacariopoyético.

Maquinaria de iniciación de la replicación en los ciclos endomitóticos

(C. Calés, R. Bermejo, F. Macías, N. Vilaboa, P. Sanjuan)

Una segunda aproximación ha sido investigar la regulación de la iniciación de la replicación durante el establecimiento de los ciclos endomitóticos. En principio, hemos abordado el estudio de uno de los factores implicados tanto en la licencia de los orígenes de replicación como en el silenciamiento de los mismos, una vez iniciada la fase S. Se trata de *cdc6*, una ATPasa implicada directamente en el ensamblaje de los complejos pre-replicativos y responsable, junto con *cdt1*, de la carga sobre el origen de replicación de los factores de licencia *mcm*, cuya actividad helicasa es requerida durante todo el proceso replicativo. La expresión de *cdc6* parece estar altamente regulada durante la endomitosis de células megacariocíticas y aparece como un elemento distintivo de la capacidad para endorreplicar. Su expresión se mantiene a lo largo de los ciclos endorreplicativos, y esto parece responder a un mantenimiento de su transcripción, así como a una estabilización de la proteína, posiblemente a través de su interacción con ciclina E. Más recientemente, hemos iniciado el estudio del segundo factor esencial para el ensamblaje de los orígenes, *cdt1* y de su regulador geminina.

Megacariocitopoyesis fetal y adulta: poliploidización y capacidad trombopoyética

(C. Calés, R. Bornstein)

Durante la megacariocitopoyesis, y de manera concomitante con la adquisición del núcleo poliploide, se produce un aumento de su tamaño y una maduración citoplásmica, que resulta en la puesta en circulación las plaquetas sanguíneas. El estudio de los mecanismos moleculares que determinan el establecimiento de la endoreplicación en esta célula es doblemente interesante, no solo porque constituye un sistema ideal para comprender los requisitos que gobiernan la obligada alternancia de fases S y M, sino también, y más relevantemente, porque la eficiente producción de plaquetas parece estar relacionada con una correcta poliploidización del megacariocito. Utilizando una aproximación experimental consistente en el estudio comparativo de megacariocitos primarios obtenidos en cultivos líquidos a partir de células madre de Sangre de Cordón Umbilical (SCU) y Sangre Periférica del Adulto (SPA), hemos obtenido evidencias de que la megacariocitopoyesis fetal presenta características de inmadurez fenotípica, consistente en una incapacidad para establecer ciclos de endoreplicación, debida a una deficiente expresión de ciclinas A y E. Las implicaciones de este estudio trascienden de corroborar los resultados obtenidos en las líneas celulares establecidas, ya que permiten explicar, al menos en parte, el retraso de recuperación de plaquetas que sufren los pacientes transplantados con SCU como fuente de implante hematopoyético, en comparación con la más eficiente trombopoyesis que se observa en el trasplante de SPA o Médula Ósea (MO) de donantes adultos.

Publicaciones

García, P., Frampton, J., Ballester, A., Calés, C. (2000). "Ectopic expression of cyclin E allows non-endomitotic megakaryoblastic K562 cells to establish re-replication cycles" . *Oncogene*. 19 1820-1833.

Moreno, G., Calés, C., Behrens, M., Fernández-Renart, M. (2000). Cloning and characterization of a casein kinase I cDNA from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* . 349 527 -537.

Vilaboa, N., Galan, A., Troyano, A., de Blas, E. y Aller, P. (2000). Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1/P-glycoprotein) gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.* 275 24970-24976.

Bornstein, R., García-Vela, J., Gilsanz, F., Auray, M.C., , Calés, C. (2001). Cord blood megakaryocytes do not complete maturation as revealed by impaired establishment of endomitosis and low expression of G1/S cyclins upon differentiation with thrombopoietin. . *British J. Haematol.* 114 1-9.

Ballester, A., Frampton, J., Vilaboa, N., Calés, C. (2001). Transcriptional repressor escargot inhibits megakaryocytic endomitosis . *J. Biol. Chem.* 276 43413-43418.

Financiación

Transcriptional control of differentiation and the cell cycle during megakaryocytopoiesis financiado por Association for International Cancer Research. Años 1997-2000

Mecanismos moleculares que controlan la re-replicación del DNA en un modelo de células humanas: diferenciación megacariocítica. (*PM98-0046*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura. Años 1999-2002

Expresión ectópica de ciclina E en progenitores hemtopoyéticos de sangre de cordón umbilical y su efecto sobre la ploidía megacariocítica. (*08.3/0001/1999*) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 2000-2000

Palabras Clave

ciclo celular, replicación del DNA, diferenciación megacariocítica

Papel de los receptores EPH y sus ligandos en el sistema inmune

Investigador principal Calvo López, Víctor, Profesor Titular UAM
Becarios Predoctorales Valero Fernández, Isabel

Lineas de Investigación

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

Los receptores tirosina quinasa (RTKs) son una familia de proteínas de la superficie celular cuya porción citoplásmica posee una actividad enzimática tirosina quinasa. La subfamilia Eph incluye los receptores tipo A (Eph-A1 a A8) que se unen preferencialmente a ligandos con unión glicofosfatidilinositol (GPI) a la superficie celular (ephrinas-A1 a A5) y tipo B (Eph-B1 a B6) que se unen preferencialmente a ligandos con unión transmembrana (ephrinas-B1 a B3). Las funciones de los receptores Eph y sus ligandos parecen más relacionados con la migración celular que con la proliferación. La detección de mRNAs de algunos de los receptores Eph y sus ligandos en órganos linfoides sugiere su posible participación en la ontogenia y las funciones del Sistema Inmune. La confirmación de esta hipótesis permitiría modular la respuesta inmune en beneficio de la salud del individuo.

Publicaciones

Sánchez-Góngora E, Lisboa C, de Gregorio R, Ballester A, Calvo V, Pérez-Jurado L (2000). Cot kinase proto-oncogene expression in T cells. . J Biol Chem . 275 31379-31386.

Financiación

Papel de los receptores Eph y sus ligandos en el Sistema Inmune. (PM99-0001) financiado por Programa de Sectorial de Promoción General del Conocimiento. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Años 2001-2003

Laboratorio de Resonancia Magnética Funcional

Investigador principal	Cerdán García-Esteller, Sebastián, Investigador Científico
Investigadores Asociados	Ballesteros García, Paloma, Catedrática de Universidad, U.N.E.D. Roda Frade, Jose María, Médico Adjunto, Servicio Neurocirugía, Hospital La Paz
Investigadores Visitantes	Ziegler, Anne, INSERM U-438 RMN Bioclinique Coles, Jonathan, INSERM U-438 RMN Bioclinique Provent, Peggy, INSERM U-438, RMN Bioclinique. Robert J. Gillies, University of Arizona, Tucson
Becarios Postdoctorales	Cruz Fernández-C., Fátima(hasta mayo 2000) Hernández Vargas, Purificación(desde septiembre 2000 hasta noviembre 2001) García Espinosa, M ^a Antonia(desde noviembre 2000 hasta diciembre 2001) García Martín, M ^a Luisa(desde junio 2001 hasta diciembre 2001)
Becarios Predoctorales	García Martín, M ^a Luisa(desde septiembre 1996 hasta junio 2001) García Espinosa, M ^a Antonia(desde septiembre 1996 hasta octubre 2001) Benito Vicente, Marina(desde octubre 2000) Morales Arcia, Francisco(desde septiembre 1996 hasta septiembre 2000) Sierra López, Alejandra(desde septiembre 2001)
Personal de Apoyo	Garrido Sierra, Susana Benedicto Palomo, Cristina(desde noviembre 2001) Toledano Sacristán, Eva María(desde noviembre 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Brandao Rodrigues, Tiago(desde octubre 1999 hasta julio 2000) Solivera Vela, Juan(desde enero 1999 hasta diciembre 2001) Carceller Lechón, Fernando(desde agosto 2000 hasta septiembre 2000)
Becarios FINNOVA	Benedicto Palomo, Cristina(desde noviembre 1999 hasta noviembre 2000) Sánchez García, Patricia (desde septiembre 2001)
Colaboraciones	Pascual Garvi, José María Servicio de Neurocirugía, Hospital

de La Princesa

García Segura, Juan Manuel, Diagnóstico por Imagen, Clínica del Rosario

Lineas de Investigación

Resonancia Magnética del Cáncer

(M.L. García, P. Hernández, J. Solivera, F. Morales, S. Garrido, C. Benedicto, P. Ballesteros, S. Cerdán)

Este proyecto desarrolla, evalúa y aplica tecnologías de Resonancia Magnética al Diagnóstico Precoz y al pronóstico del Cáncer. En este periodo se ha completado un sistema experto que permite determinar el tipo y grado de tumores cerebrales empleando técnicas de inteligencia artificial. El proceso ha involucrado la construcción de una base de datos de extractos de biopsias de tumores cerebrales, de sus espectros de Resonancia Magnética de ^1H y su posterior clasificación mediante un sistema de análisis multivariante. Por otro lado hemos continuado con el desarrollo de una nueva serie de agentes de contraste para la visualización del pH extracelular en tumores mediante ^1H RM. Los resultados han permitido obtener los primeros mapas de pH extracelular en tumores. En el modelo de gliomas C6 implantados en cerebro de ratas, el pH extracelular es heterogéneo, con un rango $6.8 < \text{pH} < 7.2$ (promedio 6.9). Este valor es ligeramente más alcalino del esperado, pero permite distinguirlo claramente de los valores de pH intracelular (ca. 7.2) o vascular (ca. 7.4). Por otro lado hemos caracterizado cuantitativamente los procesos que contribuyen al pH extracelular ácido en tumores C6. Los resultados sugieren una contribución apreciable de sistemas independientes de la producción de lactato.

Acoplamiento metabólico Neurona-Glía

(F. Cruz, M.A. García, T. Brandao, A. Sierra, S. Cerdán)

Se ha investigado mediante ^{13}C RMN cuantitativa y la utilización de diversos inhibidores selectivos, el tráfico de glutamato, glutamina y GABA entre los compartimentos neuronal y glial del cerebro intacto de rata adulta. Nuestros resultados indican una contribución importante del ciclo tricarbónico glial al consumo de oxígeno cerebral y a la producción de glutamina. Estos resultados contrastan con los que, basados en modelos matemáticos de actividad cerebral, atribuyen al ciclo glial un papel minoritario en el metabolismo cerebral y nulo como precursor de la glutamina. Tomados en conjunto, sugieren que los modelos matemáticos actuales no consideran aspectos que resultan operativos in vivo, en particular una contribución apreciable del pool de glutamato glial. También se ha

estudiado el tráfico de lactato y glucosa y su posible contribucion relativa como sustratos del metabolismo neuronal. Nuestros resultados indican que las neuronas en cultivo prefieren glucosa a lactato como sustrto y solo emplean este ultimo cuando su concentracion en el medio extracelular es elevada, lo que ocurre principalmente despues de un potencial de accion.

Metabolismo del agua en tejidos animales

(M.L. García, T. Brandao, S. Garrido, M.C. López, A. Sierra, S. Cerdán)

Hemos desarrollado metodologías de ^{13}C - ^2H RMN y de modelizacion matemática que nos han permitido determinar el turnover de los hidrogenos H_2 y H_3 de (2- ^{13}C) glutamato y (3- ^{13}C) aspartato. Nuestros resultados revelan un turnover muy rapido de estos hidrogenos que permite seguir el trafico de glutamato y aspartato a traves de citosol y mitocondria del higado de raton perfundido con (3- ^{13}C) alanina.

Agentes de Contraste de alta eficacia para Imagen por Resonancia Magnética

(Ballesteros García, Paloma , M. Benito, S. Cerdán)

Hemos continuado nuestra colaboracion con el Departamento de Química Orgánica y Biología de la Universidad a Distancia para la preparacion y validacion de una nueva serie de agentes de contraste paramagnético para imagen por Resonancia Magnética. Nuestras complexonas involucran nucleos de pirazol y presentan relajatividades r_1 ca. $15 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente tres veces superiores a las disponibles comercialmente. Estos resultados recomiendan una utilizacion más extensa de heterociclos en la sintesis de agentes de contraste y proporcionan nuevas expectativas para poder reducir las dosis manteniendo la resolucion.

Publicaciones

Cruz, F., Cerdán, S. (2000). Cells studied by NMR. En: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. (Lindon, J. and Tranter, G. eds.). Academic Press, London, 2 pp. 180-189.

García, M.L., García, M.A., Cerdán, S. (2000). ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopy. . En: MR Imaging and Spectroscopy, ESMRMB Sillabus. Bracco, Milan, pp. 1-11.

Chapa, F., Cruz, F., García, M.L., García, M.A., Cerdán, S. (2000). Metabolism of (1- ^{13}C) glucose and (2- ^{13}C , 2- $^2\text{H}_3$) acetate in the neuronal and glial

compartments of adult mammalian brain as detected by ^{13}C - ^2H NMR spectroscopy. *Neurochem. Int.* 37 217-228.

Roda, J.M., Pascual, J.M., Carceller, F., Pérez-Higueras, F., Solivera, J., Barrios, L., Cerdán, S. (2000). Non histological diagnosis of human cerebral tumors by ^1H Magnetic Resonance Spectroscopy and amino acid analysis. *Clin. Canc. Res.* 6 3983-3993.

Cruz, F., Villalba, M., García, M.A., Ballesteros, P., Bogónez, E., Satrustegui, J., Cerdán, S. (2001). Subcellular compartmentation of pyruvate in primary cultures of cortical neurons as detected by ^{13}C NMR with multiple ^{13}C labels. *J. Neurosci. Res.* 66 771-781.

García, M.L., Herigault, G., Remy, C., Farion, R., Ballesteros, P., Cerdán, S., Ziegler, A. (2001). Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Canc. Res.* 61 6524-6531.

García, M.L., Ballesteros, P., Cerdán, S. (2001). The Metabolism of water in cells and tissues as detected by NMR methods. *Progr. NMR Spec.* 39 41-77.

Hortelano, S., García, M.L., Cerdán, S., Castrillo, A., Alvarez, A.M., Boscá, L. (2001). Intracellular water motions decrease in apoptotic macrophages after caspase activation. *Cell Death Diff.* 8 1022-8.

García, M.L., García, M.A., Ballesteros, P., Bruix, M., Cerdán, S. (2001). Hydrogen turnover and subcellular compartmentation of hepatic (2 - ^{13}C) glutamate and (3 - ^{13}C) aspartate as detected by ^{13}C NMR. *J. Biol. Chem.* (papers in press, 14 Diciembre).

Tesis Doctoral

M^a Luisa García Martín

"Regulación del pH en Modelos Tumoraes Animales detectada por Resonancia Magnética Nuclear". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 2001. Director: Sebastián Cerdán. Calificación: Apto "cum laude".

M^a Antonia García Espinosa

"Alteraciones en el Metabolismo Cerebral durante la diabetes experimental detectadas por ^{13}C RMN". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 2001. Director: Sebastián Cerdán. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Resonancia Magnética en Oncología. Aplicaciones al Diagnóstico Precoz del Cáncer (08.1/0023/97) financiado por Comunidad de Madrid. Años 1997-2000

Nuevas Aplicaciones de la Resonancia Magnética al Diagnóstico Precoz del Cáncer (08.1/0046/1998) financiado por Comunidad de Madrid. Años 1998-2000

Evaluación de derivados de imidazol como nuevos agentes de contraste para imagen de pH mediante métodos de Resonancia Magnética financiado por Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A.. Años 2000-2001

Nuevos Agentes de Contraste de alta eficacia para el diagnóstico por imagen mediante métodos de Resonancia Magnética. Complexonas Heterocíclicas como ligandos de lantánidos. financiado por Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A.. Años 2000-2001

High Performance Contrast Agents for Cancer Diagnosis and Prognosis by Magnetic Resonance Methods (*Grupo Estratégico 2000-3 (grupo colaborador)*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2000-2003

Extracellular pH Regulation in tumors as detected by ^1H MRSI financiado por CSIC-INSERM acciones bilaterales. Años 2000-2001

Interacciones metabólicas entre Neuronas y Glía en cerebro de roedores y de seres humanos detectadas mediante Resonancia Magnética de carbono-13 (*SAF-2001-2245*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología. Plan Nacional. Años 2001-2003

Patentes

Productos de naturaleza de imidazol y derivados como sondas de pH para imagen por Resonancia magnética

Patente Española 9800801, fecha de prioridad 20-11-2000, publicación: 1-01-2001

Nuevos ligandos de Gd(III) con estructuras bi- y bis-azólicas

Patente Española 200100167, Prioridad: 25-01-2001.

Palabras Clave

Resonancia Magnética (RM), Cáncer, Diagnóstico y Pronóstico, Acoplamiento Neurona-Glía, Metabolismo del agua, Compartimentación metabólica, Agentes de Contraste

Estudio de las vías de señalización es estrés, diferenciación y apoptosis

Investigador principal Fernández Martín, Margarita, Profesor Titular UAM

Lineas de Investigación

Señalización celular durante la apoptosis y diferenciación de células N2A

(M.D. Lopez-Maderuelo , M.d.C. Rodríguez, J. Renart, M. Fernández-Renart)

Ver página correspondiente al Dr. Jaime Renart

Regulación de la Proteólisis Citosólica y Mitochondrial en Enfermedades Neurodegenerativas

Investigador principal	González Castaño, José, Catedrático UAM
Investigadores Asociados	Rosa de Sagarra
Becarios Postdoctorales	Mayo Melchor, Isabel(desde junio 2002 hasta junio 2004)
Becarios Predoctorales	Susana Rodríguez- Vilariño (hasta junio 2001) Isabel Mayo Melchor (hasta 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Elvira Ibeas
Colaboraciones	Rita Alvarez Doforno Pablo Díaz Villoslada Susana Alemany

Lineas de Investigación

Papel del proteasoma en sinucleinopatías

(José González Castaño , Isabel Mayo Melchor)

La degradación de proteínas en los compartimentos nuclear y citosólico es mayoritariamente llevada a cabo por un complejo proteico denominado proteinasa multicatalítica o proteasoma. En muchas enfermedades neurodegenerativas se produce un acúmulo de proteínas y la muerte celular de poblaciones específicas de neuronas. En las enfermedades por expansión de glutaminas (Huntington, Ataxia Espinocerebelosa), sinucleinopatías (Enf. de Parkinson, Demencia por cuerpos de Lewy), Taupatías (En de Alzheimer, Demencia Fronto-Temporal), se observa la aparición de agregados proteicos intracelulares insolubles. Nuestro grupo esta estudiando la ruta de degradación de la sinucleína, cuya agregación da lugar a la formación de los denominados cuerpos de Lewy, que se observan en neuronas y glia (musculo) de diferentes enfermedades (Enf. de Parkinson, Atrofia multisitémica, Demencia por cuerpos de Lewy, etc). Hemos mostrado que el proteasoma 20S es responsable de la degradación de sinucleína, tanto in vivo como in vitro. Estamos también estudiando las modificaciones post-traduccionales de sinucleína (principalmente fosforilación y nitración) y el efecto que estas modificaciones pueda tener sobre la degradación por el proteasoma de la sinucleína modificada. Por otro lado estamos interesados en la generación de modelos celulares que permitan estudiar la agregación de sinucleína, mediante la

obtención de líneas celulares que expresan bien la sinucleína silvestre o las formas mutantes (A30P y A53T) encontrados en formas familiares de Enf. de Parkinson con aparición precoz de la sintomatología

Tesis Doctoral

Susana Rodríguez- Vilariño

"Procesamiento proteolítico limitado por acción del proteasoma 20S".

Universidad Autónoma. Facultad de Medicina. 2000. Director: José González.

Calificación: Apto "cum laude".

Isabel Mayo Melchor

"Proteasoma 20S y neurodegeneración. Papel como proteasa en sinucleinopatías y como autoantígeno en Esclerosis Múltiple". Universidad Autónoma. Facultad de Medicina. 2001. Director: José González. Calificación: Apto "cum laude".

Importancia de la familia de protooncogenes Src en la señalización celular inducida por citoquinas

Investigador principal	Martín Pérez, Jorge, Científico Titular
Becarios Postdoctorales	Acosta González, Juan José(desde octubre 1999 hasta 2001)
Becarios Predoctorales	Domínguez Cáceres, M ^a Aurora García Martínez, Jose Manuel(desde julio 2000)
Estudiantes de Licenciatura	Subtil Rodríguez, Alicia(desde julio 2001)

Lineas de Investigación

Importancia de la familia de protooncogenes Src en la señalización celular inducida por citoquinas

Las citoquinas modulan un gran número de funciones fisiológicas a través de la interacción y activación de sus receptores, los cuales no poseen actividad enzimática. Tras la interacción con su ligando, estos dimerizan y activan a las tirosinas quinasas preasociadas de las familias Jak y Src, lo que provoca la fosforilación en tirosina de proteínas celulares, entre las que se encuentran el propio receptor y otras moléculas reguladoras de la actividad celular. De esta manera las citoquinas controlan procesos de supervivencia, proliferación y/o diferenciación celular.

Durante los últimos años, nuestro interés se ha centrado en el análisis de la importancia de la familia Src en la señalización celular por prolactina. La estimulación del receptor de prolactina conlleva la activación de las tirosinas quinasas Src y Jak2 (Mol.Endocrinol. 11:1461-1467; Biochem J. 345:17-24). Nuestros resultados indican que la estimulación de Src no está implicada ni en la activación de Jak2 ni en la fosforilación del receptor. Recíprocamente, tampoco la activación de Jak2 conlleva la de Src. Sin embargo, estas dos vías que son estimuladas por el receptor de manera independiente, son esenciales para la proliferación celular (Biochem J. 345:17-24; Mol.Biol.Cell 12:2171-2183).

La prolactina actúa como un inmunomodulador; la expresión de su receptor se detecta en estadios muy tempranos de la diferenciación de linfocitos B y aumenta progresivamente hasta la célula B madura, donde la prolactina actúa como un mitógeno. La expresión exógena de receptores de prolactina en la línea celular de pro-linfocitos B de ratón BaF-3, hace que la prolactina induzca la expresión de

genes de diferenciación de linaje B (λ 5 o la subunidad alfa del receptor de IL-2), así como de la proteína anti-apoptótica bcl-2. De hecho, la prolactina favorece la expansión de las células B en cultivos de medula ósea. En su conjunto, estos datos indican que la prolactina junto con otras citoquinas y hormonas modula el desarrollo de los linfocitos B (Cell Growth Diff. 10:583-590).

La importancia de la prolactina y de c-Src en cáncer de mama ha sido puesta en evidencia de manera independiente. Nosotros estamos analizando el papel de c-Src en la proliferación de las células tumorales de epitelio de mama humano T47D y MCF7 inducida por la prolactina. Los datos obtenidos indican que el protooncogén c-Src es un mediador esencial en la acción mitogénica de la prolactina en estas células tumorales. La activación de c-Src por prolactina controla secuencialmente la estimulación de la tirosina quinasa de adhesión focal (Fak), que a su vez es necesaria para la activación de las Mapks Erk1/2. De manera independiente c-Src también controla la vía de la PI3K, que es igualmente necesaria en la respuesta mitogénica. La interferencia en cada uno de los elementos de estas cascadas de señalización, inhibe la acción mitogénica de la prolactina en las células tumorales de mama T47D (En preparación).

Nuestro objetivo es continuar estudiando la relación/interacción existente entre las quinasas Src y Jak y el receptor de prolactina en los mecanismos celulares de supervivencia, proliferación, transformación tumoral y diferenciación.

Publicaciones

Fresno, J.A., Carretero, M.V., Gerónimo, H., Balmer-Hoffer, K., Martín-Pérez, J. (2000). Stimulation of c-Src by prolactin is independent of Jak2. Biochem J. . 345 17-24.

Fresno, J.A., Domínguez, M.A., Silva, A., Martín-Pérez, J. (2001). The SFK is required for Prolactin induction of pro-B lymphocytes proliferation. Mol.Biol.Cell. 12d 2171-2183.

Financiación

Mecanismos de regulación de la proliferación y de la diferenciación celular inducidos por la prolactina: implicaciones de la familia de protooncogenes Src (PM99-0113) financiado por MCT. Años 2000-2003

Prolactina y cáncer de mama: Importancia de las quinasas Src y Jak2 en la proliferación, adhesión e invasividad celular. (01/1316) financiado por FIS. Años 2000-2003

Palabras Clave

Citoquinas, prolactina, SFK, Jak2, proliferación, diferenciación celular

Relaciones estructura-función en proteínas de interés en patologías

Investigador principal	Pajares Tarancón, María Angeles, Científico Titular
Becarios Postdoctorales	Espinosa Martín, Juan Carlos
Becarios Predoctorales	Sánchez Pérez, Gabino Fco. Borniquel Gisbert, Sara
Personal de Apoyo	Garrido Pérez, Francisco
Estudiantes de Licenciatura	Cerqueira Eced, Antonio
Colaboraciones	María Gasset Vega José Luis Rodríguez Arrondo José Luis Neira Juan José Calvete Juliana Sanz Aparicio George Guillerm George Markham Germán Rivas Janice Sufrin

Lineas de Investigación

Estudios de plegamiento y asociación

(María A. Pajares, María Gasset Vega , José Luis Neira , Germán Rivas , José Luis Rodríguez Arrondo , George Markham , G.F. Sánchez)

Nuestro interés radica en el establecimiento de las rutas de plegamiento y asociación de proteínas oligoméricas, habiendo elegido para ello como modelo distintas proteínas del ciclo de la metionina. En todos los casos bajo estudio se conoce poco en cuanto a su plegamiento y la asociación de subunidades. Concretamente hemos estudiado el refolding de la metionina adenosiltransferasa a partir de cuerpos de inclusión, habiéndose determinado la presencia de un intermediario monomérico en el mismo. El procedimiento establecido permite obtener la forma dimérica de la enzima, MAT III, que puede por concentración originar la forma tetramérica MAT I. Se han analizado ambas formas y se han comparado con los datos de las formas obtenidas mediante purificación a partir de hígado de rata, observándose un comportamiento muy parecido. Además se están

estudiando las interacciones entre subunidades con el fin de conocer la estabilidad de los distintos oligómeros.

Estructura y mecanismo de reacción de proteínas del ciclo de la metionina

(Maria A. Pajares, F. Garrido, Juliana Sanz Aparicio , Janice Sufrin , George Guillerm , Juan José Calvete)

Las proteínas del ciclo de la metionina tienen relación con distintas patologías de especial interés en el hígado, pero también en enfermedades cardiovasculares. En los casos estudiados hasta el momento se ha visto una relación entre variaciones en su actividad y cambios en el estado de asociación, sin que se sepa hasta el momento que determina estas alteraciones. Nuestra forma de abordar el problema ha sido la realización de estudios estructurales a diversos niveles. Así, se ha identificado la presencia de un puente disulfuro intrasubunidad en la metionina adenosiltransferasa, establecido entre los residuos C35 y C61. Además utilizando la proteína plegada a partir de los cuerpos de inclusión se ha determinado su estructura, y se ha localizado el sitio de unión de uno de los sustratos, la metionina. También se está llevando a cabo la cristalización e presencia de otros agentes con el fin de establecer el mecanismo de la reacción. Además se ha procedido a la sobexpresión y purificación de la betaína homocisteína metiltransferasa y a su cristalización, sin que por el momento se haya concluido la determinación estructural.

Estudios estructurales en la proteína PrP

(Maria A. Pajares, J.C. Espinosa, S. Borniquel, María Gasset Vega)

Utilizamos la proteína del prion recombinante para estudios de caracterización de interacciones con distintos ligandos.

Publicaciones

Martínez, M.L., Pajares, Maria A. (2000). Assignment of a single disulphide bridge in rat liver methionine adenosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 267 132-137.

López-Vara, M.C., Gasset, M., Pajares, Maria A. (2000). Refolding and characterization of rat liver methionine adenosyltransferase from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Exp. Purif.* 19 219-226.

González, B., Pajares, Maria A., Hermoso, J.A., Alvarez, L., Garrido, F., Sufrin, J.R., Sanz-Aparicio, J. (2000). The crystal structure of tetrameric

methionine adenosyltransferase from rat liver reveals the methionine binding-site. J. Mol. Biol. 300 363-375.

López-Vara, M.C., Martínez, M.L., González, B., Gasset, M., Alvarez, L., Garrido, F., Hermoso, J., Sanz-Aparicio, J., Pajares, Maria A. (2000). Identification and possible role of a disulfide bond in rat liver methionine adenosyltransferase. Methionine metabolism: Molecular mechanisms and clinical implications V. Universidad de Navarra, 247-254.

Financiación

Relaciones estructura/función en la metionina adenosiltransferasa hepática: Regulación por glutatión del ciclo de la metionina en hígado de rata (*PM97-0064*) financiado por Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento. Años 1998-2001

Destoxificación de priones y terapia en prionopatías financiado por Neuropharma. Años 2001-2001

Diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles en sangre: metodologías de tipaje genético y amplificación-detección de conformeros aberrantes (*BIO2000-0175-P4-02*) financiado por Plan Nacional de I + D + I, Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (Modalidad P4). Años 2001-2004

Implicaciones estructurales y de plegamiento en el comportamiento de enzimas del ciclo de la metionina (*01/1077*) financiado por Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud del Ministerio de Sanidad y Consumo. Años 2001-2003

Palabras Clave

metionina adenosyltransferasa, betaína, homocisteína, metiltransferasa, PrP, estructura y función

Departamento de Regulación de la Expresión Génica

Mecanismos de regulación de la expresión génica por los receptores nucleares

Investigador principal	Aranda Iriarte, Ana, Profesor de Investigación
Investigadores Contratados	Nevado Blanco, Julian(desde 2000 hasta junio 2000) Sánchez Pacheco, Aurora
Becarios Postdoctorales	Castillo Varón, Ana Isabel Scsuková , Sona(desde septiembre 2000)
Becarios Predoctorales	Cañón Sánchez, Estela García Silva, Susana María Méndez Perfuz, Marinela
Personal de Apoyo	Sánchez-Prieto Borja, Milagros(desde mayo 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Moreno Carboneros, Jose Luis(desde octubre 2001)

Lineas de Investigación

Mecanismos de regulación de la expresión génica por los receptores nucleares

(A.I. Castillo, J.L. Moreno, J. Nevado, S. Scsuková, A. Sánchez, M. Sánchez-Prieto, A. Aranda)

Los receptores nucleares pueden activar o inhibir la transcripción génica de una forma dependiente de ligando a través de su unión a elementos de respuesta hormonal (HREs). Utilizando como modelo tanto promotores heterólogos a los que se les insertan diferentes HREs, como promotores naturales como los del gen de la prolactina, de la hormona de crecimiento, el LTR del virus del HIV etc., estamos analizando los mecanismos de estimulación transcripcional por los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico, estrógenos o vitamina D. Nuestros datos indican la gran complejidad de esta regulación en la que participan no solamente diferentes grupos de coactivadores y corepresores, cuya interacción con el receptor depende de la unión del ligando correspondiente, sino también diferentes factores de transcripción tanto ubícuos como específicos de tejido que pueden determinar la actividad transcripcional de los receptores. La situación parece ser aún más compleja, ya que la asociación de los receptores con componentes de la maquinaria basal de transcripción y con componentes de la holoenzima de la RNA Polimerasa II, así como de éstos con corepresores y coactivadores modulan la activación por los receptores nucleares. En el caso de los HREs negativos, los mecanismos de inhibición por los receptores nucleares son

poco conocidos. En el caso del receptor de hormonas tiroideas TR, el receptor vacío produce un aumento transcripcional que se revierte en presencia de ligando. En esta estimulación paradójica parece jugar un papel los corepresores y las modificaciones de proteínas de la cromatina como la acetilación o la metilación de histonas.

Mecanismos de diferenciación neuronal por el ácido retinoico

(E. Cañón, S. Scsuková, A. Aranda)

El RA provoca diferenciación neuronal con extensión de neuritas en células A126-1B2, un subclón de células PC12 deficientes en protein kinasa A (PKA). Las células A126-1B2 expresan altos niveles de receptores de RA que las células parentales, en las que el RA no causa diferenciación morfológica. Un proceso central en la diferenciación causada por neurotrofinas es la rápida expresión de genes de respuesta “temprana” como resultado de la activación de la cascada de las MAP kinasas ERKs. Esta activación conduce a la fosforilación de factores de transcripción entre los que se encuentra el CREB (cyclic AMP response element binding protein) que parece jugar un papel crucial en la diferenciación neuronal. Hemos observado que el tratamiento de las células A126-1B2 con RA produce una fosforilación rápida y sostenida de CREB y un incremento de la actividad transcripcional de este factor de transcripción. Esta activación requiere la previa estimulación de ERK que ocurre a los pocos minutos del tratamiento con el retinoide. Como consecuencia, el RA causa la activación de la transcripción de genes como c-Fos, c-Jun o Jun-B, pero que contienen sitios CRE o TRE. Los datos obtenidos sugieren que el RA estimula vías de transducción de señales y la expresión de genes tempranos implicados en la diferenciación neuronal por un mecanismo extragenómico que no parece requerir la unión de los receptores de RA a elementos de respuesta RAREs en sus promotores.

Inhibición de las respuestas al oncogén ras por los receptores de hormonas tiroideas

(S.M. García, A. Aranda)

Los receptores de hormonas tiroideas (TRs) pueden modular la transcripción por unión directa a elementos de respuesta, o a través de la modulación de la actividad de otras vías de transducción de señales. Tanto la hormona tiroidea (T3), como el oncogén ras, que se encuentra mutado en un gran número de tumores, tienen importantes efectos en procesos de proliferación y diferenciación celular. Hemos observado que la T3 antagoniza fuertemente la proliferación inducida por Ras en las células de neuroblastoma N2a-b. Una de las dianas más importantes para los efectos proliferativos de Ras es la ciclina D1, y la T3 bloquea la activación de la

transcripción del gen de la ciclina D1 en respuesta a Ras. La T3 también inhibe la activación del promotor del gen de la ciclina D1 por Raf y MAPK (pero no por la RSK2). El antagonismo de las respuestas transcripcionales a Ras por la T3 se observa en diferentes tipos celulares y con otros promotores, como los de las CKIs p21 y p27. En el caso de la ciclina 1, la activación por Ras está mediada por secuencias cercanas a la caja TATA que contienen un elemento CRE cuya mutación abole la respuesta al oncogén. A esta secuencia se unen factores como CREB o ATF-2 cuya actividad transcripcional se activa en las células N2a-b que expresan el Ras oncogénico. La T3 es capaz de reprimir directamente la actividad transcripcional de ambos factores. Estos resultados indican que las hormonas tiroideas tienen importantes efectos moduladores sobre las vías de transducción de señales estimuladas por el oncogén ras, lo que puede jugar un papel muy importantes en procesos no solo de proliferación, sino también de transformación celular. Este hipótesis se confirma por el hecho de que Ras oncogénico es incapaz de producir transformación de fibroblastos transfectados con TRs, en ensayos de formación de focos, tras el tratamiento con T3. Actualmente se está analizando la posibilidad de que este receptor pueda también inhibir el crecimiento tumoral “in vivo” en ratons desnudos.

Antagonismo transcripcional entre los receptores de hormonas tiroideas y CREB

(M. Méndez, A. Sánchez, A. Aranda)

La regulación combinatorial de la transcripción puede implicar tanto unión de los factores de transcripción al DNA, como interacciones proteína-proteína. Hemos demostrado la existencia de un antagonismo transcripcional mutuo entre los receptores de hormonas tiroideas (TRs) y el factor CREB que implica una asociación directa entre ambos factores de transcripción. La T3 reduce la fosforilación de CREB en la serina 133, inhibe su actividad transcripcional y reprime la activación de promotores que contienen elementos CRE pero que carecen de elementos de respuesta TREs. A su vez, CREB reduce las respuestas transcripcionales dependientes de TR. La interacción entre estos factores mapea en el dominio de unión a DNA del receptor y el dominio b-Zip de CREB. La asociación de TR con CREB disminuye la unión “in vitro” de ambos factores a sus sitios de reconocimiento en el DNA, inhibe la fosforilación de CREB por la proteína quinasa A y produce una reducción del reclutamiento de coactivadores p160 por el receptor. Estos resultados indican la existencia de un “cross-talk” entre la señalización por CREB y el receptor nuclear que puede tener gran trascendencia funcional, ya que modula la expresión de genes clave para la función hipofisaria como el factor de transcripción GHF-1/Pit-1, necesario para la

expresión de los genes de la hormona de crecimiento, la prolactina o la hormona tirotrópica.

Publicaciones

Pérez, G., Aranda, A. (2000). Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor-1 is associated with induction of retinoic acid receptor gene expression. *Oncogene*. 18 5393-5402.

Pérez, G., García, S.M., Aranda, A. (2000). An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 275 1307-1314.

Recio, J.A., Martínez, J., Martín, J., Aranda, A. (2000). Retinoic acid stimulates HIV-1 transcription in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*. 469 118-122.

López, J.M., Palacios, D., Castillo, A.I., Tolón, R.M., Aranda, A., Karin, M (2000). Differentiation of lactotrope precursor GHFT cells in response to Fibroblast Growth Factor-2. *Journal of Biological Chemistry*. 275 21653-21660.

Tolón, R.M., Castillo, A.I., Aranda, A. (2000). Association with Ets-1 causes a ligand- and AF2-independent activation of nuclear receptors. *Molecular Cellular Biology*. 20 8793-8802.

Jiménez, A.M., Aranda, A. (2001). Interaction of vitamin D and retinoid receptors on regulation of gene expression. *Hormone Research*. 54 301-305.

Cosgaya, J.M , Aranda, A. (2001). Nerve growth factor activates the RARb2 promoter by a Ras-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*. 76 661-670.

Pascual, A , Aranda, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*.

Tesis Doctoral

Marinela Méndez Perfuz

"Antagonismo transcripcional entre el receptor de hormonas tiroideas y el factor de transcripción CREB". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2001. Director: Ana Aranda. Calificación: Apto "cum laude".

Estela Cañón Sánchez

"Activación de CREB y regulación de genes tempranos por ácido retinoico en el subclón A126-1B2 de células PC12". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2001. Director: Ana Aranda. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Regulación de la expresión génica por los receptores nucleares en células hipofisarias y neuronales: interacción con factores de crecimiento y neurotrofinas (PM97/0135) financiado por DGES. Años 1998-2001

Efectos antiproliferativos de ligandos de receptores nucleares en células de tumores hipofisarios y neuronales: Modulación de la actividad de vías de transducción de señales de factores de crecimiento y oncogenes financiado por CAM. Años 1999-2000

Regulación transcripcional de la expresión del gen de la prolactina: Inducción por bFGF y el oncogen RAS. Aceptores nucleares de Ras e interacción con receptores nucleares financiado por Fundación Salud 2000. Serono.. Años 1999-2000

Premios

Premio de Investigación PHARMACIA & UPJOHN sobre "Neuroendocrinología" (2000)

Premio SERONO 2000 de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (2000)

Fundación de Ciencias de la Salud (2001)

Palabras Clave

Receptores nucleares, transcripción, proliferación, diferenciación y transformación celular

Mecanismos de regulación de la transcripción de genes musculares

Investigador principal	Cervera Jover, Margarita, Profesor Titular UAM
Becarios Postdoctorales	Mas Gutierrez, José Antonio Arredondo Lamas, Juan Jose
Becarios Predoctorales	Marco Ferreres, Raquel (desde septiembre 1999) Garcia Zaragoza, Elena (desde marzo 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Leon Muñoz, Rosario (desde octubre 2000 hasta julio 2001) Calvo Macarro, Francisco Javier (desde octubre 2001 hasta julio 2002)
Colaboraciones	Bernstein, Sandford (UCSD, USA) Fraile, Benito (Universidad Alcala) Heidenreich, Olaf (University Tuebingen, Alemania). Molano, Jesus (Hospital La Paz)

Lineas de Investigación

Regulación transcripcional de los genes musculares en *Drosophila*: Los genes de la Troponina T y de la paramiosina

(J.A. Mas Gutierrez , R. Marco Ferreres , E. Garcia Zaragoza , J. J. Arredondo , R. Leon , F. J. Calvo , M. Cervera)

La formación del patrón espacio-temporal muscular correcto requiere de un control estricto de la expresión de los genes musculares. Los genes de paramiosina/ miniparamiosina y de troponina T de *Drosophila* son un buen modelo de estudio para contribuir al esclarecimiento de dicha regulación, tanto en *Drosophila* como probablemente en mamíferos. Para entender los mecanismos de regulación de la transcripción de estos genes se han realizado estudios in vivo de transformantes en la línea germinal, obtenidos por inserción de elementos-P. El gen reporter, β -galactosidasa, se colocó bajo el control de secuencias seleccionadas. La expresión del transgén se analizó en los músculos de las moscas transgénicas obtenidas. La comparación con *D. virilis* de los promotores ha sido especialmente útil para la identificación de posibles regiones importantes a nivel funcional. Los mRNAs de la paramiosina (PM) y la miniparamiosina (mPM) se generan a partir de dos unidades de transcripción solapantes cuya transcripción se regula a partir de dos promotores diferentes. El promotor de la mPM se localiza

en el intrón 7 del gen. El análisis de las líneas transgénicas dio como resultado que la región MEF-E presente en el promotor de la PM actúa como un activador muscular distal. Mutaciones de sustitución de los distintos sitios indican que esta región controla la expresión en los músculos larvarios y de adultos de manera diferente. El papel del sitio MEF2 y de las cajas E es diferente en la miogénesis larvaria y de adultos. En la musculatura larvaria, el sitio MEF 2 es esencial para mantener los niveles de transcripción. Las cajas E no parecen desempeñar ningún papel. En la musculatura adulta, en cambio, la ausencia de cualquiera de las cajas E o del sitio MEF2 produce solo una mínima reducción de la actividad del transgén pero aparece una expresión errónea en IFM. La interacción directa de un complejo regulador conteniendo MEF2 parece necesitarse para dar especificidad a la expresión de la PM en distintos músculos individuales. En el promotor de la mPM, el elemento BF2 es un región de 32 pb conservada en *D. virilis* que tiene un papel importante en el control de la expresión de la mPM en los músculos torácicos. Experimentos de híbrido sencillo en levadura han demostrado que a esa región se une exclusivamente PDP1. El análisis de los resultados indican que si existieran otros factores estos se unirían vía PDP1. El gen de la troponina T codifica por una proteína contráctil que forma parte del filamento fino del sarcómero en todos los tipos de músculo. Está formando un complejo junto con las troponinas I y C y la tropomiosina. En *Drosophila*, el gen de la troponina T presenta un primer exón no codificante, así como, tres exones que se procesan de forma alternativa produciendo 4 mensajeros con especificidad de tipo muscular. El control de la transcripción del gen de la troponina T a lo largo del desarrollo se lleva a cabo por elementos presentes en la región 5' y en el intrón 1. Ambas regiones son capaces de dirigir la transcripción del transgen al mismo nivel y con la misma especificidad espacio-temporal, excepto en los músculos de vuelo. Los resultados indican que dos activadores independientes regulan la expresión del gen de la TnT. La disección y la introducción de mutaciones en los secuencias de unión a determinados factores presentes en estas regiones nos ha permitido demostrar el papel funcional de los elementos que las componen. Así, sabemos que la región situada entre -2.5 y -1.1 kilobases contribuye a establecer los patrones de expresión espaciotemporal de la TnT en los músculos de salto. Hemos identificado dos sitios MEF-2 conservado en *D. virilis* en -2.4 y en -1.3 kb. El elemento que controla la expresión en el conducto dorsal (corazón) se sitúa entre -1.1 y -0.8 kb. Hemos identificado dos sitios para TINMAN (Nkx 2) conservados en esta región. En este momento se están mutando estos sitios para demostrar la implicación de estos sitios.

La expresión diferencial de la Troponina T, generada por transgénesis, en *Drosophila*, produce efectos diferentes en las miofibrillas

(R. Marco Ferreres , J.J. Arredondo , B. Fraile , O. Heidenreich , M. Cervera)

Los genes musculares que se requieren para el ensamblaje del aparato contractil se activan o reprimen coordinadamente. Usando *Drosophila* como modelo hemos podido analizar los mecanismos reguladores que controlan los genes musculares en un organismo intacto. Se generaron líneas de moscas transgénicas que expresan la troponina T en diferentes versiones, salvaje y mutantes y en distintas cantidades, en los músculos de vuelo y se estudiaron sus fenotipos musculares: test de vuelo, microscopia electrónica, niveles de proteínas y mensajeros. Para ello, se usó un promotor específico que dirige la expresión a estos músculos. La sobreexpresión de la troponina T salvaje, incluso en cantidades realmente pequeñas, produce en el músculo de vuelo disfunciones realmente importantes. Por otra parte, la reducción de la cantidad de mRNA del TnT endogeno mediante la expresión de una ribozima específica produce un efecto en el fenotipo muscular mucho menor. En resumen, la presencia de un ligero exceso de TnT en las miofibrillas tiene un fuerte impacto sobre el fenotipo muscular. Sin embargo, una ligera reducción tiene un efecto realmente leve en el ensamblaje muscular y en su función. Este trabajo ha permitido demostrar la importancia de la troponina T a la hora de regular los niveles de expresión de las proteínas que componen el filamento fino. Cualquier alteración de la estequiometría de esta proteína, por pequeña que sea, en el músculo, altera totalmente la capacidad funcional de este músculo y genera rápidamente un fenotipo distrófico, con desaparición de masa muscular en el tórax.

Publicaciones

Arredondo, J.J., Marco Ferreres, R., Maroto, M., Cripps, R., Marco, R., Bernstein, S., Cervera, M. (2001). Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression: Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription . *J. Biol. Chem.* . 276 8278-8287.

Arredondo, J., Cripps, R., Cervera, M., Bernstein, S. (2001). Overexpression of miniparamyosin causes muscle dysfunction and age dependant myofibril degeneration in the Indirect Flight Muscles of *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. & Cell Motil.* . 22 287-299.

Financiación

Función y control de la regulación de los genes de la paramiosina/miniparamiosina y de la TnT en *Drosophila* (PB97-0034) financiado por DGICYT. Años 1998-2001

Cardiomiopatía hipertrófica familiar: caracterización de las mutaciones asociadas y desarrollo de un modelo experimental para el análisis funcional de los genes mutados (08.4/0035/1998) financiado por CAM. Años 1999-2001

Palabras Clave

Transcripción, Genes musculares, Drosophila, Transgénesis

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

Investigador principal	Cruces Pinto, Jesús, Profesor Titular UAM
Investigadores	Coloma Jerez, Antonio(IIB) (hasta octubre 2000)
Asociados	Pérez Jurado, Luis Alberto (hasta abril 2000)
Investigadores	de Juan Chocano, Carmen (U. Complutense de Madrid) (desde
Visitantes	abril 2000 hasta julio 2001)
Becarios Postdoctorales	Falcón Pérez, Juan Manuel (desde 2000 hasta marzo 2001)
	Valero Quiros, M ^a Carmen
Becarios Predoctorales	Prados Pinto, Belén (desde noviembre 2000)
	Peña Cotarelo, Rocío (desde agosto 2001)
Estudiantes de	
Licenciatura	Peña Lobo, Almudena (desde septiembre 2001)
Becarios FINNOVA	Incera González, Ignacio (desde noviembre 2000 hasta
	noviembre 2001)
	Oliveros Gómez, Eva, (hasta noviembre 2000)
Colaboraciones	Quintanilla Avila, Miguel (IIB)

Lineas de Investigación

Estudio de la posible implicación del gen POMT1 en patologías neuromusculares congénitas

(J.M. Falcón, B. Prados, M.C. Valero, R. Peña, A. Peña, A. Coloma, J. Cruces)

El gen POMT1 es el ortólogo humano del gen "rotated abdomen" (rt) de *D. melanogaster*, cuya mutación homocigota recesiva es causante de anomalías musculares en la larva. Por tanto, mutaciones similares en humanos podrían ser la causa de algún tipo de distrofia muscular congénita (DMC). POMT1 se localiza en 9q43.1, es de expresión ubicua, y codifica una proteína con una secuencia homóloga a las O-manosil transferasas de levadura (Pmts). Se trata del primer hallazgo de una proteína de este tipo en mamíferos. Actualmente, estamos investigando su posible implicación en ciertas distrofias musculares candidatas preferentemente con afectación neuronal, dado que hasta la fecha, la única proteína con O-manosilación es el alfa-distroglicano, que posee una función primordial en células neuronales y musculares. Mediante el sistema de dos híbridos estamos estudiando las posibles proteínas diana de la manosiación

(además del alfa-distroglicano) u otras proteínas necesarias para la función de manosilación. También hemos caracterizado el gen Pomt1 murino ortólogo, y posicionado en el genoma de ratón, para correlacionarlo con algún fenotipo mutante candidato posicionado en la región. Además, hemos comenzado los primeros pasos hacia la producción del “knock-out” de Pomt1 en ratón, habiendo iniciado ya las transfecciones con la construcción en células ES de ratón 129SvJ.

Estudios en Drosophila como modelos de enfermedad (mutantes ortólogos para POMT1 y POMT2)

(M.C. Valero, R. Peña, A. Peña, J. Cruces)

Hasta el momento, parece ser que en eucariotes superiores solamente existen dos genes que codifiquen protein-O-manosil transferasas. Recientemente hemos caracterizado otra posible manosil transferasa en Drosophila localizada en el cromosoma X. Se ha caracterizado el mutante correspondiente como el ortólogo de POMT2 humano. Se están realizando estudios con este mutante a fin de comprobar sus similitudes y diferencias con rotated/POMT1, tanto a nivel molecular como de función. Además, se realizarán dobles mutantes para observar su fenotipo, y comprobar si son necesarias ambas manosiltransferasas para la función, o si requieren diferentes sustratos nanosilables.

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

(L.A. Pérez, M.C. Valero, R. Peña, B. Prados, J. Cruces)

En la misma region 9q34.1 hemos caracterizado el gen que hemos denominado UHG62 (U Host Gene), por codificar en uno de sus intrones el snoRNA U62. Se ha caracterizado este gen al completo, conteniendo 2 mensajeros de 10 y 12 Kb respectivamente, que se expresan en todos los tejidos analizados. La región codificante de este gen tiene homología con otras 2 proteínas cuya función se desconoce, y cuyos genes se localizan en 6p21.3 y 1q23.1-24.3. Todas tienen una zona muy rica en glutaminas en su extremo más amino-terminal. Este tipo de repeticiones puede sufrir expansión génica y aumentar el número de glutaminas, lo que lleva a la agregación y precipitación de la correspondiente proteína. Este hecho es la causa de bastantes enfermedades neurodegenerativas. Además, en esta región cromosómica 9q34.1 se ha posicionado un tipo de esclerosis lateral amiotrófica, (ALS4) que cursa con acúmulos protéicos en las células neuronales. Actualmente, estamos caracterizando el gen completo, y la posible implicación en de este gen en enfermos con esclerosis lateral amiotrófica ligada a 9q34.1.

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

(M.C. Valero, J. Cruces, L.A. Pérez)

El síndrome de Williams-Beuren (SW) es un trastorno del desarrollo con manifestaciones multisistémicas que afectan fundamentalmente al sistema nervioso, al aparato cardiovascular y al tejido conectivo. Está causado por haploinsuficiencia para genes delecionados en la banda cromosómica 7q11.23, de alrededor de 1,6 Mb. Hemos caracterizado que el mecanismo por el que se produce la deleción en el SW es la recombinación desigual meiótica tras un mal alineamiento cromosómico propiciado una duplicación genómica situada en ambos flancos. Se está estudiando la contribución en el fenotipo del SW de algunos de genes delecionados, sobre todo de aquellos que pudieran contribuir en el fenotipo cognitivo de la enfermedad. En paralelo, se ha establecido el mapa de la región sinténica en el ratón y se ha determinado que el orden y orientación de todos los genes del intervalo delecionado en humanos se encuentra preservado en el ratón. El mapa detallado de la región murina se está utilizando como para intentar generar un modelo de ratón con la misma deleción que el humano, mediante el sistema Cre-loxP de pasos sucesivos de recombinación homóloga en células ES.

NOTA: Esta línea de trabajo ya no se lleva a cabo en el laboratorio)

Caracterización de un nuevo gen implicado en cancer de pulmón

(C. de Juan, J. Cruces)

En colaboración con el grupo de Manuel Benito de la U. Complutense, y al que pertenece la Dra. De Juan, en mi laboratorio se ha venido caracterizando un nuevo gen implicado en cáncer de pulmón. Previamente se había demostrado mediante AP-PCR que en carcinoma no microcítico de pulmón existía una secuencia amplificada que se posicionaba en 6p21. Hemos caracterizado esta secuencia, la cual se encuentra en el primer intrón de un nuevo gen que hemos caracterizado, el cual se sobreexpresa en varios tumores. La proteína que codifica tiene características de molécula de adhesión, lo cual estaría en concordancia con su posible implicación en progresión tumoral. Se han comenzado los estudios funcionales de esta nueva proteína, así como la caracterización del tamaño del amplicón, por comprobar si otros genes amplificados de esta región contribuyen a la patologías.

Caracterización molecular del gen humano PA2.26

(J. Cruces, M. Quintanilla)

Esta línea de trabajo se lleva a cabo en el laboratorio del Dr. Quintanilla, de este mismo Centro. Ver la descripción detallada en su correspondiente apartado.

Publicaciones

Valero, M.C., Luis, O.d., Cruces, J., Pérez, L.A. (2000). Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region in mouse chromosome 5G: The low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of evolutionary inversions(s). *Genomics*. 69 1-13.

Financiación

Estudio de la posible implicación de la proteína O-manosil transferasa 1 humana y murina en anomalías musculares congénitas (08.6/0023/98) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 1999-2001

Caracterización de los genes humanos POMT1 y UHG62, del locus cromosómico 9q34.1. Estudio de su posible implicación en enfermedades neuro-musculares (SAF2000/0033) financiado por CICYT. Años 2000-2003

Palabras Clave

Genética Molecular Humana, patologías neuromusculares hereditarias, proteína-O-manosil transferasas, *Drosophila*, knock-out, esclerosis lateral amiotrófica, Síndrome de Williams, cáncer de pulmón

Regulación hormonal de la expresión de los genes mitocondriales

Investigador principal	García Vallejo, Carmen, Científico Titular
Personal de Apoyo	Seguido de la Fuente, Ana M ^a
Colaboraciones	Rodríguez Peña, María Angeles

Lineas de Investigación

Regulación hormonal del factor nuclear de transcripción GABP/NRF-2 implicado en biogénesis mitocondrial

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

La hormona tiroidea (TH) regula la función mitocondrial activando de forma coordinada la transcripción en el núcleo y la mitocondria. Se sabe que la activación de la transcripción de los genes mitocondriales por TH es directa, pero la de los genes mitocondriales de origen nuclear se sospechaba que debía ser indirecta. Por otra parte, estaba descrito que los factores de transcripción nucleares NRF-1 y GABP/NRF-2 estaban implicados en la regulación de la transcripción de varias subunidades de la cadena respiratoria y del factor de transcripción mtTFA, todas proteínas codificadas en el núcleo. Se había sugerido que NRF-1 y NRF-2 podrían coordinar la expresión de los dos genomas, ser activados por TH y activar a su vez los promotores OXPHOS. Sin embargo, la regulación transcripcional de NRF-1 y NRF-2 por TH no se había demostrado hasta el momento. Hemos estudiado en el hígado de ratas hipotiroideas el efecto de la administración de TH sobre estos factores. Los resultados indicaron que TH aumenta los niveles de la subunidad α de GABP/NRF-2 sin afectar significativamente los de las otras subunidades β y γ . Los niveles del mensajero de NRF-1 solo aumentaron ligeramente. Experimentos de "run-on" indicaron que los aumentos en la concentración de los mRNAs eran debido a aumentos en la velocidad de transcripción y experimentos de "time-course", que la proteína de la subunidad α de GABP/NRF-2 también aumentaba en proporción semejante. Nuestros datos indican que TH activa de forma específica la transcripción de GABP/NRF-2, a través de la activación de la subunidad α . En paralelo, se midió el RNA de la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial que, como estaba descrito anteriormente, aumentó con la administración de TH. La expresión de la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial está regulada por TH y GABP/NRF-

2. Nosotros hemos observado por primera vez que, en los experimentos de "run-on" y "time-course", el aumento de transcripción de la subunidad β de la ATP sintasa es posterior a la de la subunidad α de GABP/NRF-2. Estos resultados apoyan la idea de que los genes mitocondriales codificados en el núcleo son regulados por TH mediante medios indirectos.

La expresión de tubulina y la organización del citoesqueleto aparecen afectados en ratones carentes de receptores de hormona tiroidea

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

Las mitocondrias no se encuentran fijas sino localizadas en regiones específicas de la célula donde se requieren mayores concentraciones de ATP. Aunque los mecanismos moleculares implicados en la localización intracelular de las mitocondrias no se conocen bien, se sabe que sus alteraciones dan lugar a diferentes patologías y que los microtúbulos tienen un papel fundamental en la dinámica mitocondrial. La tubulina es un dímero compuesto de subunidades α y β que se expresan en cantidad semejante entre sí, pero a distintos niveles dependiendo del tejido, tanto en ratas como ratones adultos. Sin embargo, hemos observado durante el desarrollo postnatal del hígado de la rata que los niveles de la proteína α son altos en la rata recién nacida y muy bajos, los de la β . Durante los días siguientes, la α disminuye y la β aumenta de manera que hacia finales del periodo las dos proteínas alcanzan niveles semejantes. Estos patrones de expresión se ven afectados en neonatos hipotiroideos, observándose en las dos proteínas patrones de expresión semejantes a la de β tubulina de los hígados neonatos normales, aunque a niveles más bajos. Los hígados de las ratas adultas hipotiroideas tienen niveles bajos de proteína β que se recuperan por administración de TH. Con el objeto de estudiar la posible implicación diferencial de los dos receptores de TH en la expresión de la tubulina, hemos analizado los niveles de las dos subunidades en hígados de ratones silvestres y en ratones carentes de receptores α ó β . Los niveles de β tubulina aumentan en los ratones carentes de receptor α y disminuyen en los que no tienen receptor β . En los animales hipotiroideos, los niveles de β tubulina, en relación con el animal normal, disminuyen en los hígados normales y carentes de receptor α pero aumentan en los que no tienen receptor β . TH revierte este efecto. Los resultados son compatibles con la idea de que el receptor β (mayoritario en hígado) es el responsable de la expresión de β tubulina pero que el receptor α ejerce un efecto represor cuando está ligado a TH, que se expresa como una mayor sensibilidad a TH en los animales que no tienen este receptor. El análisis histológico de los hígados de los ratones silvestres y knockout no presenta diferencias significativas pero el análisis por microscopía confocal de la inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β y anti- α tubulina confirma los resultados obtenidos con técnica

de western y evidencia una cierta desorganización del citoesqueleto de tubulina. El análisis de la localización mitocondrial en estos animales no demuestra cambios significativos, por lo que mecanismos compensatorios deben funcionar para preservar la importante función mitocondrial.

Publicaciones

Vallejo, C.G., Escriva, H., Rodriguez-Peña, A. (2000). Evidence of tissue-specific, post-transcriptional regulation of NRF-2 expression. *Biochimie*. 82 1129-1133.

Garesse, R., Vallejo, C.G. (2001). Animal mitochondria biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*. 263 1-16.

Financiación

Bases fisiológicas de la acción de la hormona tiroidea en la mielinización (*PM97-0066*) financiado por Ministerio de Educación y Cultura. Años 1998-2001

Palabras Clave

mitocondria, hormona tiroidea, GABP/NRF-2, beta-ATP sintasa, tubulina, receptores de hormona tiroidea, ratones knockout , inmunofluorescencia

Fisiopatología de la biogénesis mitocondrial

Investigador principal	Garesse Alarcón, Rafael, Catedrático UAM
Investigadores Asociados	Fernández Moreno, Miguel Bornstein Sánchez, Belén
Investigadores Visitantes	Martínez Azorín, Francisco
Becarios Predoctorales	Adan Rovira, Cristina Peña Ingelmo, Pablo de la
Personal de Apoyo	Ochoa Cao, Pilar
Colaboraciones	Laurie Kaguni. Michigan State University. USA Joaquín Arenas. Hospital 12 de Octubre. Madrid

Lineas de Investigación

Biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster*

(M.A. Fernandez-Moreno, Adán Rovira, Cristina , de la Peña, Pablo , Ochoa Cao, Pilar , Garesse Alarcón, Rafael)

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

estableciendo por primera vez un nexo de unión entre las replications de los DNAs mitocondrial y nuclear durante el ciclo celular. Actualmente estamos caracterizando las regiones promotoras de diversos genes que codifican factores de las maquinarias de replicación y transcripción mitocondrial: helicasa, mtTFA, mtTFB y RNA polimerasa.

Caracterización molecular de enfermedades neurodegenerativas de origen mitocondrial

(Bornstein Sánchez, Belén , Fernández Moreno, Miguel Ángel , Garesse Alarcón, Rafael)

En consonancia con su función central en el metabolismo y homeostasis celular, las mutaciones en genes mitocondriales, codificados tanto en el núcleo como en la mitocondria, provocan un amplio espectro de patologías, usualmente con un fenotipo devastador. Las enfermedades mitocondriales, fundamentalmente alteraciones en la función OXPHOS, se asocian a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, mayoritariamente disfunciones neurológicas degenerativas, que incluyen ceguera, sordera, demencia, trastornos del movimiento, ataxia, corea y encefalopatías. Los defectos mitocondriales se asocian también con debilidad muscular, fallo cardíaco, diabetes, disfunciones renales, enfermedad hepática, etc. Se trata por tanto de un grupo de enfermedades multisistémicas, difíciles de diagnosticar y tratar, y de una gran relevancia socio-sanitaria. Aunque su diversidad clínica y genética hace difícil determinar su incidencia exacta en la población, se estima que es relativamente elevada. Sólo las alteraciones de la función OXPHOS causadas por mutaciones conocidas en el mtDNA afectan al menos a uno de cada 8.500 habitantes. Uno de los principales problemas que tiene planteado el campo de la patología mitocondrial es que no existe una correlación clara entre genotipo (mutación) y fenotipo (patología que origina). Por otro lado, la alta velocidad de mutación del mtDNA está originando que se describan una serie mutaciones asociadas a diferentes enfermedades que sólo constituyen polimorfismos presentes en la población. En colaboración con el grupo del Dr. Joaquín Arenas (Hospital 12 de Octubre, Madrid) estamos interesados en la identificación de nuevas mutaciones y en el estudio molecular de las mismas. Para ello estamos utilizando diferentes líneas celulares a las que se les ha eliminado su mtDNA (r0), con mitocondrias de fibroblastos de pacientes con enfermedad mitocondrial, y realizando un estudio bioquímico y molecular de las alteraciones que provoca la mutación. La disponibilidad a medio plazo de un banco de líneas celulares portadoras de distintas variantes patogénicas del mtDNA en combinación con distintos genomas nucleares, permitirá un análisis de la respuesta del sistema OXPHOS al tratamiento con diferentes fármacos, dependiendo de la mutación y el contexto nuclear. Un segundo objetivo dentro de

esta línea de investigación es la identificación de genes nucleares responsables del síndrome de depleción mitocondrial. Estamos estudiando 15 casos, y de los genes descritos actualmente sólo uno de ellos tiene una mutación en el que codifica la timidina kinasa, lo que indica la heterogeneidad genética de la enfermedad.

Drosophila melanogaster como modelo de patología mitocondrial

(Martínez Azorín, Francisco , Garesse Alarcón, Rafael)

La falta de modelos animales adecuados es otro de los retos importantes que tiene planteado actualmente el campo de la patología mitocondrial. Una tercera línea de trabajo de nuestro grupo está dirigida a generar líneas de *Drosophila* que manifiesten un fenotipo de disfunción mitocondrial. Para ello estamos utilizando dos estrategias diferentes: i) manipular el sistema de replicación del mtDNA sobreexpresando in vivo versiones normales (silvestres) y mutadas de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa mitocondrial, tanto de un modo constitutivo como en tejidos específicos; ii) generar moscas transgénicas en las que se sustituyan genes silvestres que codifiquen factores de la maquinaria de replicación mitocondrial, por las versiones de los mismos que contengan mutaciones específicas detectadas en patología humana. Actualmente disponemos de las condiciones experimentales adecuadas para generar una depleción de mtDNA. Así mismo, hemos generado líneas transgénicas que acumulan mutaciones en el mtDNA, ya que hemos eliminado la actividad correctora de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa γ , y estamos estudiando el posible efecto que provoca en el proceso de envejecimiento. Hemos comenzado a generar las versiones mutantes del gen pol γ -a y mt-helicasa con diferentes mutaciones identificadas en patología humana, con objeto de sustituir in vivo el gen silvestre por el mutado. Una vez generadas las moscas transgénicas realizaremos un estudio de las alteraciones que provocan en la biogénesis mitocondrial, centrándonos más específicamente en los procesos de neurogénesis y miogénesis. Por otro lado, a medio plazo aplicaremos una estrategia genética, ya utilizada con éxito por otros grupos, que nos permita identificar genes que modulen el fenotipo in vivo.

Publicaciones

Ruiz de Mena, I., Lefai, E., Garesse, R., Kaguni, L.S. (2000). Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 275 13628-13636.

Lefai, E., Fernandez-Moreno, M.A., Kaguni, L.S., Garesse, R. (2000). Structure of the highly compact mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: evolutionary and functional implications. *Insect Mol. Biol.* 9 315-322.

Lefai, E., Fernández-Moreno, M.A., Alahari, A., Kaguni, L.S., Garesse, R. (2000). The expression of the catalytic and accessory subunits of the mitochondrial DNA polymerase are differentially regulated in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275 33123-33133.

Fernández-Moreno, M.A., Bornstein, B., Campos, Y., Arenas, J., Garesse, R. (2000). About the pathogenic role of point mutations affecting the translational initiation codon of mitochondrial genes. *Mol. Genet. Metabol.* 70 238-240.

Lefai, E., Calleja, M., Ruiz de Mena, I., Lagina III, A.T., Kaguni, L.S., Garesse, R. (2000). Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase produces mitochondrial DNA depletion in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 264 37-46.

Fernandez-Moreno, M.A., Bornstein, B., Petit, N., Garesse, R. (2000). The pathophysiology of mitochondrial biogenesis: towards four decades of mitochondrial DNA research. *Mol. Genet. Metabol.* 71 481-495.

Fernandez-Moreno, M.A., Ruiz de Mena, I., Garesse, R. (2000). Regulation of mitochondrial biogenesis during development and cell differentiation. *Current Topics in Biochem. Res.* 2 127-136.

Campos, Y., Gámez, A., García, A., Andreu, A.L., Rubio, J.C., Martín, M.A., del Hoyo, P., Navarro, C., Cervera, C., Garesse, R., Arenas, J. (2001). A new mtDNA mutation in the tRNA Leu(UUR) gene associated with ocular myopathy. *Neuromuscular Disord.* 11 477-480.

Garesse, R., Vallejo, C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene.* 263 1-16.

Campos, Y., García-Redondo, A., Fernandez-Moreno, M.A., Martínez-Pardo, M., Goda, G., Rubio, J.C., Martín, M.A., del Hoyo, P., Cabello, A., Bornstein, B., Garesse, R., Arenas, J. (2001). Early onset multisystem mitochondrial disorder due to a nonsense mutation in the mitochondrial COX II gene. *Ann. Neurol.* 50 409-413.

Peña, P.d.l., Bornstein, B., del Hoyo, P., Fernandez-Moreno, M.A., Martín, M.A., Campos, Y., Gómez-Escalonilla, C., Molina, J.A., Cabello, A., Arenas, J., Garesse, R. (2001). Mitochondrial dysfunction associated with mutations in the Notch gene of *Drosophila* and the Notch3 gene of CADASIL patients. *Neurology*. 57 1235-1238.

Ugalde, C., Ochoa, P., Pérez, M.L., Fernandez-Moreno, M.A., Calleja, M., Alahari, A., Kaguni, L.S., Garesse, R. (2001). Identification of a proximal promoter region critical for the expression of the beta F1 ATPase gene during *Drosophila melanogaster* development. *Mitochondrion*. 1 225-236.

Financiación

Caracterización de factores reguladores del proceso de biogénesis mitocondrial en *Drosophila melanogaster* (*PB97-0034*) financiado por DGICYT. Años 1998-2000

Patofisiología de la biogénesis mitocondrial en sistema nervioso: caracterización molecular de enfermedades neurodegenerativas de origen mitocondrial (*08.5/0003/1997*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 1997-2000

Enfermedades neurodegenerativas de origen mitocondrial: caracterización molecular en un modelo celular (cíbridos) y animal (*Drosophila melanogaster*) (*08.5/0013/2000*) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2000-2001

Testing the mitochondrial theory of ageing (*QLRT-2000-0054*) financiado por Unión Europea. Años 2001-2003

Palabras Clave

mitocondria, *Drosophila melanogaster*, replicación del mtDNA, patología mitocondrial, enfermedades neurodegenerativa, control de la expresión génica

La regulación de la contracción muscular en *Drosophila* y la adaptación al ambiente espacial

Investigador principal	Marco Cuellar, Roberto, Catedrático UAM
Investigadores Asociados	F. J. Medina
Becarios Postdoctorales	Husson , David
Becarios Predoctorales	Díaz Castillo, Carlos Herranz Barranco, Raul Mateos Martín, Jesús Ruiz González, José María
Personal de Apoyo	Villa Benayas, Aida
Estudiantes de Licenciatura	Celia Zamarro García Jacobo Trebol López

Lineas de Investigación

Prueba

(E. Caso, R. Herranz)

Este es un texto de ejemplo

Esto es un cambio de línea

Letras en griego como por ejemplo " α " y en *cursiva*

Regulación de la Contracción Muscular en *Drosophila*

Durante estos dos años hemos extendido nuestros estudios a los otros dos componentes de la Troponina, la TnI y la TnC, continuando trabajando en la TnT y en otro componente del músculo de vuelo, la TnH, isoformas de la tropomiosina II. Hemos identificado los genes y las proteínas en los casos en que no se conocían. Hemos obtenido anticuerpos contra ellas y estudiado sus propiedades en otras *Drosophilidae*

Preparación de experimentos en la Estación Espacial Internacional

Durante estos dos años hemos seguido avanzando en la preparación tanto de los dispositivos que permitirán el cultivo multigeneracional de *Drosophila* en la ISS (International Space Station) como la modificación de la metodología experimental que permitirá realizar experimentos en las condiciones restringidas

de aquel ambiente. Estamos preparando una Unidad de Fijación de embriones y adultos, así como de preparación de muestras para la observación microscópica en el Espacio. Finalmente y utilizando los dispositivos de simulación de gravedad alterada en Tierra, estamos explorando las condiciones experimentales que luego llevarán progresivamente a nuestro objetivo, el establecimiento de una colonia permanente de *Drosophila* en el espacio para estudiar la adaptación y los efectos a largo plazo de este ambiente muy diferente sobre los animales superiores.

Publicaciones

Alekhova T, Sofin A, Kobelkova T, Marco R, Dournon C (2001). Sex-linked differences in activity of enzymes in the blood of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* . 130 819-825.

. Arredondo, J. J., Ferreres, R. M., Maroto, M., Cripps, R. M., Marco, R., Bernstein, S. I, M. Cervera (2001). Control of *Drosophila* Paramyosin/Miniparamyosin Expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription. *J Biol Chem.* 278 8278-87.

Marco, R (2001). Las teorías del Caos y Los Sistemas Complejos. *Proyecciones Biológicas. Encuentros Multidisciplinares.* 3 (7) 51-55.

Marco, R (2001). La Universidad del Siglo XXI: Aspectos a mejorar. *Encuentros Multidisciplinares.* 3 (8) 32-43.

Financiación

.Aislamiento, Caracterización Molecular y genética de los Componentes de la Troponina de *Drosophila melanogaster*. financiado por Plan General del Conocimiento. Años 1998-2000

.La Estacion Espacial Internacional y la adaptacion de los seres vivos a la Microgravedad: Diseño y puesta a punto de experimentos durante su fase de ensamblaje (2000-2002)". financiado por Plan Nacional del Espacio. Años 2000-2002

La adaptación a largo plazo de los seres vivos al ambiente espacial: Diseño y puesta a punto de experimentos y prototipos instrumentales para la estación espacial internacional: Estudios de artrópodos” financiado por Plan Nacional del Espacio. Años 2001-2004

Patentes

Procedimiento de esterilización basado en el tratamiento con agentes químicos
bajo irradiación con microondas

P 200000874

Palabras Clave

Drosophila,, Músculo,, Troponinas, , Espacio, Gravedad alterada, Desarrollo,
Envejecimiento, Metodología Espacial

Mecanismos implicados en la regulación de APP (amyloid precursor protein)

Investigador principal	Pascual García, Angel, Investigador Científico
Becarios Postdoctorales	Santiago Martín, Jorge
Becarios Predoctorales	Ruiz León, Yolanda Villa Martínez, Ana M ^a
Becarios FINNOVA	Muñoz Mayoral, Evangelina Aguayo Ferrer, Concepción
Colaboraciones	Luis M. Blanco-Colio

Lineas de Investigación

Regulación transcripcional de APP mediada por receptores nucleares y de membrana

(J. Santiago, Y. Ruiz, A.M. Villa, E. Muñoz, C. Aguayo , A. Pascual)

La expresión de APP (b-amyloid precursor protein), proteína que juega un papel central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, se regula por diferentes mediadores celulares a través de receptores localizados en núcleo o membrana celular. En particular, datos de nuestro laboratorio han demostrado que en células de neuroblastoma las hormonas tiroideas pueden regular negativamente su expresión a nivel transcripcional, a través de mecanismos en los que participan el receptor nuclear y elementos específicos de respuesta localizados en la región reguladora del gen. La identificación y caracterización de estos elementos y la de factores y proteínas que contribuyen a la activación transcripcional constituyen el interés central de nuestra investigación. También en células de neuroblastoma hemos descrito que factores de crecimiento, como el BDNF, y otros ligandos que actúan a través de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, pueden activar vías de señalización que finalmente inducen la expresión del gen APP. La caracterización de estas cascadas de señalización, en particular las vías Ras/MAPK y PI3K, son como en el caso anterior una de las líneas prioritarias de nuestro laboratorio.

Publicaciones

L.M. Blanco-Colio, A. Villa, M. Ortego, M.A. Hernández-Presa, A. Pascual, J.J. P (2001). 3-hydroxi-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors Atorvastatin and Simvastatin induce apoptosis in vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and RhoA prenylation. *Atherosclerosis*. 161 17-26.

Y. Ruiz-León and A. Pascual (2001). Nerve growth factor modulates the expression and secretion of b-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. Nerve growth factor modulates the expression and secretion of b-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. *J. Neurochem.* . 77d 1077-1084.

A. Aranda and A. Pascual (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*. 81 1269-1304.

A. Villa, M.J. Latasa, and A Pascual (2001). Brain derived neurotrophic factor stimulates b-amyloid gene promoter activity by a Ras-dependent / AP-1-independent mechanism in SH-SY5Y neuroblastoma cells. . *J. Neurochemistry*. 79 278-285.

Tesis Doctoral

Yolanda Ruiz León

"Efectos del ácido retinoico sobre la expresión de APP en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y de feocromocitoma de rata PC12".
Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2001. Director: Angel Pascual. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de la proteína b-amiloide en células de feocromocitoma (PC12) y de neuroblastoma (SH-SY5Y y N2A) (*SAF97-0183*) financiado por CICYT. Años 1997-2000

Regulación de la expresión del gen de la proteína b-amiloide: Efecto de las hormonas tiroideas y ligandos de receptores con actividad tirosina quinasa (*SAF2000-0177*) financiado por CICYT. Años 2001-2003

Palabras Clave

Enfermedad de Alzheimer, Proteína b-amiloide, precursor APP, Neuroblastoma, Cultivos celulares, Neuroblastoma, Transcripción, Receptor nuclear, Vías de señalización, Receptor de membrana

Estudio genético del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y otras enfermedades endocrino-metabólicas

Investigador principal	Peral Fuentes, Belén, Científico Titular
Becarios Predoctorales	Cortón Pérez, Marta
Colaboraciones	Héctor Escobar-Morreale (Hospital Ramón y Cajal) José Luis San Millán (Hospital Ramón y Cajal) Gemma Villuendas (Hospital Ramón y Cajal)

Lineas de Investigación

Estudio genético del Síndrome de Ovario Poliquístico y otras enfermedades endocrino-metabólicas: análisis de genes candidatos y aplicación de la tecnología de los microarrays de DNA.

(B. Peral, M. Cortón, Héctor Escobar-Morreale , José Luis San Millán , Gemma Villuendas)

El síndrome de ovario poliquístico (PCOS), es una enfermedad muy común en mujeres en edad fértil, afectando al 6.5% de éstas. Es la forma más frecuente de hiperandrogenismo, o exceso androgénico, en la mujer, seguido por el hirsutismo sin disfunción ovulatoria. En la actualidad se sabe que el PCOS se asocia a enfermedades metabólicas, destacando la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la dislipemia, y que las mujeres con PCOS tienen aumentada la morbi-mortalidad por enfermedad cardiovascular y cáncer endometrial respecto a las mujeres no afectadas. Se trata de una patología compleja, es decir más de un gen estaría implicado en la enfermedad y además junto con los componentes genéticos, coexisten también componentes ambientales y sociales.

Se están analizando genes candidatos implicados en diversas rutas metabólicas y reguladoras que podrían estar alteradas en PCOS, por ejemplo, genes involucrados en la síntesis de hormonas esteroideas, en la actuación de la gonadotropina, en el peso corporal y en rutas de señalización de la insulina. Hasta la fecha se han analizado varios SNPs en el gen Calpaína-10 (CAPN10), identificado como un gen de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2. También se han analizado SNPs del gen que codifica para el receptor tipo 2 del factor de necrosis tumoral (TNFRSF1B), que media en la mayoría de las respuestas metabólicas del TNF-

alfa. En ambos casos se han encontrado SNPs asociados a PCOS e hiperandrogenismo femenino. En la actualidad estamos estudiando la asociación de otros genes a estas patologías, como son el gen PTP-1B, que codifica para la tirosín fosfatasa 1B, el gen PON1, que codifica para la Paraoxonasa 1, el gen que codifica para la adiponectina, etc.

Para poder entender mejor el síndrome de ovario poliquístico a nivel genético-molecular, se pretende aplicar la tecnología de los microarrays de DNA. Con esta estrategia podremos averiguar los genes que se expresan de manera diferencial en tejido afectado, comparándolo con tejido normal. El ovario y la cápsula suprarrenal son los dos tejidos diana para PCOS. En nuestros experimentos utilizaremos el RNA extraído de las células tecales de los folículos del ovario, tanto de mujeres afectadas como normales. Los genes que se encuentren alterados (bien sobre-expresados o reprimidos) debido a la enfermedad nos llevarán a descubrir otras rutas celulares activadas o inhibidas que por un lado propongan nuevos genes candidatos relacionados con PCOS, o bien confirmen los ya existentes. Por otro lado, estamos comenzando a poner a punto los geles bidimensionales de proteínas, como una tecnología complementaria a las anteriores, con el objeto de caracterizar proteínas que están alteradas en el tejido afectado comparado con tejido sano, debido a la presencia de la enfermedad. La identificación de dichas proteínas se llevará a cabo mediante técnicas de espectrometría de masas.

Publicaciones

Sumoy L, Carim L, Escarceller M, Nadal M , Gratacos M, Pujana M, Estivill X,, Peral, B. (2000). HMG20A and HMG20B map to human chromosomes 15q24 and 19p13.3 and constitute a distinct class of HMG-box genes with ubiquitous expression. *Cytogenetics Cell and Genetics*. 88 62-67.

Palou E, Piroto F, Solé J, Freed JH , Peral, B., Vilardell C, Vilella R, Vives J, Gayá A (2000). Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains . *Tissue Antigens* . 55 118-122.

Pujana MA, Nadal M, Gratacos M , Peral, B., Csiszar K, González- Sarmiento R, Sumoy L, Estivill X. (2001). Additional Complexity on Human Chromosome 15q: Identification of a set of newly recognized duplicons (LCR15) on 15q11-q13, 15q24 and 15q26.1. *Genome Research* . 11 98-111.

Rossetti S, Strmecki L, Burton S, Sneddon V , Peral, B., Roy S, Bakkaloglu A, Komel R, Winearls C , Harris, P (2001). Mutation analysis of the entire PKD1 Gene: Genetic and Diagnostic Implications. Am J Hum Genet . 68 46-63.

Gratacos M, Nadal M, Martín-Santos R , Pujana MA, Gago J , Peral, B., Armelgol L, Ponsa I, Miró R , Bulbena A,.Estivill X (2001). A polymorphic genomic duplication on human chromosome 15 is a susceptibility factor for Panic and Phobic disorders . Cell. 106(3) 367-379.

Lázaro C, Nunes V , Peral, B., Ugarte, M (2000). Patología molecular hereditaria congénita I. En: Tratado de Medicina Interna Farreras/Rozman (14 edición . (Farreras y Rozman eds.). Harcourt Brace de España, S.A, Barcelona, Cap 160

Financiación

Estudio genético del síndrome de ovario poliquístico: análisis de la expresión diferencial de genes utilizando Microarrays de cDNA (08.6/0024/2000.1) financiado por Comunidad de Madrid. Años 2001-2002

Palabras Clave

Patología humana, Estudio genético, SNP, Gen candidato, Expresión génica, Microarray de DNA, Gel bidimensional

Papel de los receptores nucleares y de los factores de transcripción egr-1, C/EBP α y C/EBP β en la diferenciación y apoptosis neurales.

Investigador principal	Pérez Castillo, Ana, Científico Titular
Investigadores Asociados	Angel Santos Montes
Becarios Predoctorales	Patricia Sainz de los Terreros (desde octubre 1999 hasta octubre 2000) Arturo Perez-Rendon Guillo (desde noviembre 1999 hasta enero 2001) Cortés Canteli, Marta(desde septiembre 1998) Pignatelli Moreno, Miguel(desde septiembre 1997) Sánchez Rodríguez, Jinny (desde septiembre 2001) Kaninda Tshilumbu, John Patrick(desde septiembre 1999)
Estudiantes de Licenciatura	Luna Medina, Rosario(desde septiembre 2001)
Colaboraciones	Rosa Maria Bergoc (desde 2001) Cary Lai (desde agosto 1997) Markus Schwab (desde junio 2000) Cocca , Claudia(desde 2001)

Lineas de Investigación

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

(M. Pignatelli, R. Luna, A. Santos, A. Pérez-Castillo)

Egr-1 es un factor de transcripción que es rápidamente activado en células quiescentes por mitógenos o en neuronas post-mitóticas como consecuencia de la despolarización. Se ha implicado a egr-1 en una gran variedad de funciones biológicas como crecimiento celular y diferenciación. Nosotros hemos demostrado previamente que este factor es capaz de inducir diferenciación en células de neuroblastoma N2A y que esta inducción de la diferenciación está asociada con un aumento en la cantidad e MAP1B fosforilada, la cual se requiere en las primeras etapas de la diferenciación neuronal. Posteriormente hemos encontrado que egr-1 es capaz de inducir apoptosis en estas mismas células. La

sobreexpresión de *egr-1* en células N2A aumenta significativamente la apoptosis de estas células en presencia tanto como en ausencia de suero. Por el contrario el tratamiento de las células con oligos antisentido para *egr-1* se acompaña por un incremento en la viabilidad celular. La apoptosis inducida por *egr-1* no parece estar mediada por p53 ya que tanto los niveles de proteína como su actividad no se modifican al sobreexpresar este factor. Los clones que expresan de forma estable *egr-1* presentan también una disminución en el ritmo de crecimiento con una parada en fase Go/G1.

Papel de la proteína C/EBPbeta en la diferenciación y apoptosis neuronales.

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

C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas con motivo bZIP. Desde hace tiempo se sabe que esta proteína es indispensable para la diferenciación de adipositos. Sin embargo es prácticamente desconocido qué papel pueda jugar en el sistema nervioso. Nosotros hemos estudiado la posible presencia de C/EBP β en el cerebro en desarrollo y su papel en la diferenciación y apoptosis de células neurales. Hemos demostrado que la proteína C/EBP β se encuentra en diversas partes del cerebro de ratas de 5 y 15 días de edad postnatal. Mediante la generación de clones estables para esta proteína en células de neuroblastoma N2A hemos demostrado que su sobreexpresión induce diferenciación, la cual es inhibida por la sobreexpresión del dominante negativo CHOP. Hemos encontrado también que, al igual que ocurre durante la diferenciación de adipocitos, C/EBP induce la expresión de otro miembro de la familia de C/EBPs: C/EBP α y que la sobreexpresión de esta es también por sí sola capaz de provocar un fenotipo diferenciado en células N2A. La diferenciación neuronal inducida por C/EBP β requiere la activación de la ruta de señalización de la fosfatidil inositol 3-kinasa (PI-3K), mientras que la activación de la ruta de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) no parece necesaria. Finalmente hemos demostrado también que C/EBP β induce apoptosis neuronal a través de la activación de p53 y del inhibidor de cdk's p21. Todos estos datos sugieren un importante papel de C/EBP β en la maduración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso.

Papel de la prostaglandina 15-deoxy-D-12,14-prostaglandin (PG-J2) y de la vitamina D3 en la neurogénesis postnatal y del adulto en la rata.

(R. Luna, P. Sainz de Terreros, A. Santos, A. Pérez-Castillo)

La capacidad del Sistema Nervioso Central para producir nuevas neuronas es limitado, volviéndolo por tanto vulnerable a las agresiones externas y a diversas enfermedades. En los mamíferos, la gran mayoría de las neuronas se generan en el

período prenatal, pero se ha demostrado que aún en el adulto siguen generándose neuronas, al menos en dos regiones del cerebro de mamíferos: el giro dentado del hipocampo y los ventrículos laterales. Estas neuronas se originan a partir de poblaciones de "células madre" y de su progenie, menos multipotente, las "células progenitoras". En el hipocampo las neuronas granulares surgen en la zona subgranular del giro dentado. En la región anterior de los ventrículos laterales se forman las células progenitoras las cuales migran hacia el bulbo olfatorio a través de una zona denominada la corriente migratoria rostral (RMS). Entender qué factores promueven la división de estas células madre y regulan la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de su progenie, las más diferenciadas "células progenitoras", es un paso muy importante hacia el propósito de ser capaces de utilizar poblaciones de células madre endógenas para inducir la producción de nuevas neuronas y glía. Esta capacidad será de gran utilidad en clínica a la hora de reemplazar células neurales perdidas como consecuencia de daños externos o enfermedades. Nosotros hemos encontrado que la 15-deoxy- Δ -12,14-prostaglandina J2 (15dPG-J2) y la vitamina D3, ligandos de dos miembros de la superfamilia de receptores nucleares: PPAR γ y VDR, respectivamente, inhiben la proliferación de estos progenitores neurales e inducen un fenotipo neuronal cuando se transfieren a un sustrato adherente. Además la vitamina D3 parece capaz de regular la expresión de moléculas de adhesión ya que el tratamiento con este factor provoca adhesión y migración de células madre creciendo en ausencia de sustrato adherente

Implicación del receptor nuclear PPAR γ en el desarrollo del cáncer de mama.

(M. Pignatelli, M. Cortés-Canteli, C. Cocca, A. Santos, A. Pérez-Castillo)

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. Existen tres miembros de esta superfamilia: PPAR γ , PPAR α y PPAR δ . Los PPARs funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. Para el PPAR γ se han encontrado varios ligandos, siendo la prostaglandina 15-deoxy- Δ -12,14-prostaglandin J2 (15dPG-J2) el más potente de ellos. Se sabe desde hace tiempo que PPAR γ juega un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Nosotros hemos demostrado que la activación de PPAR γ por 15dPG-J2 provoca una inhibición prácticamente total de la fosforilación de los receptores tirosina kinasa ErbB2 (neu) y ErbB3 inducida por neuregulina 1 y neuregulina 2 en diversas líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7, T47D y SKBR3. Esta inhibición está acompañada por un bloqueo de los efectos de estos receptores sobre proliferación y apoptosis en estas células. El tratamiento de estas células con 15dPG-J2 tiene como consecuencia un bloqueo

de la proliferación con una parada en G0/G1, consecuencia en parte de la inhibición de la ruta de señalización de PI-3K, y un aumento en la apoptosis, consecuencia de la inhibición de la activación de ERK1/ERK2 por neuregulina 1 y neuregulina 2. 15dPG-J2 suprime también la fosforilación de otros receptores tirosina kinasa como el IGF-IR, en estas mismas células. Estamos ahora investigando el mecanismo por el cual 15dPG-J2 ejerce sus efectos antitransformantes en células de cáncer de mama. Después de un screening diferencial hemos encontrado varios genes regulados por 15dPG-J2 en células MCF-7. Entre ellos hay varios genes mitocondriales, sugiriendo una implicación de la mitocondria en la apoptosis inducida por esta prostaglandina. En efecto, un análisis de los mecanismos bioquímicos implicados muestra que el tratamiento de células MCF-7 con 15dPG-J2 provoca una disfunción mitocondrial que conduce a una liberación de citocromo-c, una bajada en la diferencia de potencial de membrana mitocondrial y una activación de la caspasa 7. La sobreexpresión de bcl-2 revierte completamente la disfunción mitocondrial y la apoptosis inducida por 15dPG-J2. Estos cambios están asociados con una inhibición de NFkB, implicado en la supresión de la apoptosis en otros sistemas, y son independientes de la activación de p53.

Publicaciones

Menéndez, A.I., Santos, A., Pérez-Castillo, A. (2000). Characterization of the promoter region of the rat CCAAT/enhancer binding protein alpha gene and regulation by thyroid hormone in rat immortalized brown adipocytes. *Endocrinology*. 141 4164-4170.

Santos, A., Pérez-Castillo, A. (2000). Molecular mechanisms of thyroid hormone action on brain development. *Recent.Res.Devel. Endocrinol.* 1 59-84.

Martinez, B., Del Hoyo, P., Martin, MA, Arenas, J., , Pérez-Castillo, A., Santos, A. (2001). Regulation by thyroid hormone of oxidative phosphorylation and mitochondrial gene expression in the cerebral cortex and striatum of developing rats. *J. Neurochem.* 78 1-11.

Pignatelli, M., Cortés-Canteli, M., Santos, A., Pérez-Castillo, A. (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor-g is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J.Cell.Science.* 114 4117-4126.

Financiación

Papel de la mitocondria en el efecto de la hormona tiroidea en el desarrollo cerebral. Caracterización de factores mitocondriales implicados. (PM97/023) financiado por Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Promoción General del Conocimiento.. Años 1998-2001

Palabras Clave

Apoptosis, diferenciación, genes tempranos, neuronal, receptores nucleares, cancer

Estudio de la función del factor de transcripción de respuesta a suero (SRF) en procesos de diferenciación celular y morfogénesis

Investigador principal	Sastre Garzón, Leandro, Científico Titular
Investigadores Contratados	Escalante Hernández, Ricardo
Investigadores Visitantes	Ortiz-Caro Hoyos, Javier
Becarios Postdoctorales	Casero Martín, Marie-Carmen(desde junio 2000 hasta diciembre 2000)
Becarios Predoctorales	Casero Martín, Marie-Carmen(hasta mayo 2000) Martínez Lamparero, Ana(hasta noviembre 2001) Avila Arroyo, Sonia(hasta junio 2001) Moreno Garoz, Nicolás(desde junio 2000) Vicente Ruiz, Juan Jesús(desde septiembre 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Vicente Ruiz, Juan Jesús(hasta junio 2000) Fernández Cantón, Rocío(desde octubre 2000 hasta junio 2001) Ciria de Pablo, Esther(desde octubre 2001)

Lineas de Investigación

Análisis funcional comparativo de factores SRF de vertebrados e invertebrados

(S. Avila, M. Casero, R. Fernández, L. Sastre)

El factor de transcripción de respuesta a suero (Serum Response Factor, SRF) contiene un dominio de unión a DNA y dimerización muy conservado a lo largo de la evolución de animales y hongos. Es la denominada caja MADS. Otras regiones de la proteína apenas muestran similitud entre las distintas especies. Por otro lado, la función descrita para SRF es muy diferente en las distintas especies animales donde se ha estudiado. Para tratar de profundizar en las posible consecuencias funcionales de estas similitudes y diferencias, hemos comparado la actividad de SRFs de tres especies animales, una de vertebrados (*H. sapiens*) y dos de invertebrados (*D. melanogaster* y *A. franciscana*), en células de mamífero en cultivo. Los resultados obtenidos indican que las regiones de unión a DNA y

dimerización están funcionalmente conservadas y son intercambiables entre los SRFs de distintas especies. Sin embargo, no se observa conservación funcional en las regiones de activación transcripcional, situadas en la región C-terminal del SRF humano. Las regiones correspondientes de los SRFs de *D. melanogaster* y *A. franciscana* no actúan como dominios de transactivación. Moléculas híbridas que contienen el dominio de unión a DNA y dimerización humano y la región C-terminal de *D. melanogaster* o *A. franciscana* actúan como represores transcripcionales sobre promotores que contienen sitios de unión para SRF

Regulación del factor SRFA de *D. discoideum* durante los procesos de morfogénesis y diferenciación celular

(R. Escalante, L. Sastre)

El factor de transcripción SRFA se expresa específicamente durante el periodo de morfogénesis del cuerpo fructífero de *D. discoideum* y no en la fase de crecimiento vegetativo. Ensayos de interrupción génica han demostrado que este factor es necesario para la diferenciación terminal de las esporas, así como en otras etapas, peor definidas, del proceso previo de morfogénesis. Para tratar de conocer mejor cual es la participación en estos procesos hemos comenzado el estudio de los factores que regulan su expresión en los distintos tipos celulares y estadios de desarrollo del cuerpo fructífero. El gen *srfa* se transcribe desde cuatro promotores diferentes, asociados a cuatro exones no codificantes. El procesamiento de estos RNAs une cada uno de estos exones a un único exon 2 donde se sitúa el inicio de traducción por lo que todos estos mRNAs codifican la misma proteína. Esta organización genética posibilita una gran flexibilidad transcripcional puesto que cada promotor presenta una especificidad celular diferente y es activado en un momento específico del proceso de desarrollo. Además, hemos observado que cada promotor responde de forma diferente a distintas señales extracelulares. El promotor 2 es inhibido por cAMP extracelular y DIF-1. Los promotores 3 y 4 son activados, conjuntamente, por cAMP intracelular. Estamos tratando de identificar las principales regiones funcionales de estos promotores, en particular, las responsables de su especificidad celular de expresión y de la respuesta a señales extracelulares

Identificación y análisis funcional de genes regulados por SRFA en *D. discoideum*

(N. Moreno, J.J. Vicente, E. Ciria, R. Escalante, L. Sastre)

SRFA desempeña un papel importante en los procesos de morfogénesis y diferenciación celular en *D. discoideum*, como describimos brevemente en el párrafo anterior. Dado que esta proteína es un factor de transcripción, pensamos

que estas funciones son realizadas a través de la regulación de la expresión de otros genes efectores. Hemos comenzado una línea de trabajo centrada en el aislamiento de genes cuya expresión está regulada por SRFA, tratando de establecer las funciones específicas que cada uno de ellos ejerza en los procesos de diferenciación celular y morfogénesis que estamos estudiando. En primer lugar, hemos sintetizado genotecas de cDNA diferenciales enriquecidas en genes que se expresen en cepas silvestres pero no en cepas que tienen el gen *srfa* interrumpido. Una de las genotecas fue sintetizada con RNA aislado de estructuras intermedias de desarrollo (slugs) y otra de estructuras terminales (cuerpos fructíferos). Hasta el momento hemos aislado 7 genes que muestran expresión diferencial, estando muy disminuida en las cepas con el gen *srfa* interrumpido. Cinco de estos clones corresponden a genes que se expresan específicamente en los estadios terminales de desarrollo y dos se expresan también en estadios intermedios. En la actualidad estamos profundizando en el estudio de la expresión y función de estos genes. Uno de los ensayos de mayor interés consiste en anular la expresión de estos genes para determinar la morfología y posibles anomalías en el desarrollo de las cepas resultantes

Estudio funcional de los promotores del gen de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *A. franciscana*

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

La activación del embrión enquistado de *A. franciscana* supone la reanudación de su actividad metabólica y del programa de desarrollo embrionario. Este proceso supone la reactivación de la transcripción génica, entre otros muchos procesos. Nuestro laboratorio ha estado interesado en el estudio de los mecanismos implicados en la activación de la transcripción durante los últimos años. El gen que codifica la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico aumenta marcadamente su expresión durante este proceso y es uno de los genes que hemos empleado en este estudio. En este proyecto hemos analizado las principales regiones reguladoras de los dos promotores alternativos que regulan la expresión de este gen. Hemos realizado un análisis funcional, estudiando la actividad de los promotores, y de distintas regiones de los mismos, en células de mamíferos. También hemos ensayado la presencia de regiones de los promotores a las que se unieran específicamente proteínas nucleares de *A. franciscana*. Como resultado de estos estudios hemos podido definir algunas regiones funcionales, especialmente en uno de los promotores. Posteriormente hemos analizado la posible presencia de proteínas que se unieran específicamente a estas regiones presentes en extractos de quistes o nauplias de *A. franciscana*. Los resultados obtenidos indican la existencia de factores proteicos en extractos de nauplias que no están en los extractos de quistes. Estas observaciones son compatibles con un modelo de

activación de la transcripción basado en la ausencia, o insuficiente presencia, de factores de transcripción en los quistes en criptobiosis. Una vez reactivado el quiste estos factores serían sintetizados, quizás a partir de mRNAs almacenados, produciéndose la activación de los distintos promotores y la transcripción de los correspondientes genes

Publicaciones

García Sáez, Alberto., Escalante, R., Sastre, L. (2000). High DNA sequence variability at the $\alpha 1$ Na/K-ATPase locus of *Artemia franciscana* (Brine Shrimp): Polymorphism in a gene for salt-resistance in a salt-resistant organism. *Mol. Biol. Evol.* 17 235-250.

Casero, M., Sastre, L. (2000). A Serum Response Factor homologue is expressed in ectodermal tissues during development of the crustacean *Artemia franciscana*. *Mech. of Develop.* 96 229-232.

Escalante, R., Vicente, J.J. (2000). *Dictyostelium discoideum*: a model system for differentiation and patterning. *Int J. Dev. Biol.* 44 819-835.

Casero, M., Sastre, L. (2001). Characterization of a functional serum response element in the Actin 403 gene promoter region from the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* 268 2587-2592.

Escalante, R., Vicente, J.J., Moreno, N., Sastre, L. (2001). The MADS-box gene *srfa* is expressed in a complex pattern under the control of alternative promoters and is essential for different aspects of *Dictyostelium* development. *Develop. Biol.* 235 314-329.

Escalante, R., Sastre, L. (2001). cAMP and DIF-1 repress the expression of the *Dictyostelium* MADS-box gene *srfa* at early stages of development. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 285 820-824.

Moreno, N., Vicente, J.J., Escalante, R., Sastre, L. (2001). The MADS-box transcription factor SRFA regulates different aspects of *Dictyostelium discoideum* development. *Int. J. Dev. Biol.* 45 (S1) S117-S118.

Tesis Doctoral

Marie-Carmen Casero Martín

"Estudio del promotor de actina 403 de *Artemia*. Clonación y estudio del factor SRF de *Artemia*". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Leandro Sastre. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Ana Martínez Lamparero

"Análisis de los dos promotores alternativos del gen de la ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico de *Artemia franciscana*". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2001. Director: Leandro Sastre. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Tesis de Licenciatura

Sonia Avila Arroyo

"Estudio comparativo de factores de respuesta a suero y elementos de respuesta a suero de vertebrados e invertebrados". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Leandro Sastre. Calificación: Sobresaliente.

Financiación

Estudio funcional del factor de transcripción de respuesta a suero (SRF) en procesos de diferenciación celular financiado por Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Años 1999-2002

Palabras Clave

Transcripción, SRF, *Dictyostelium discoideum*, *Artemia franciscana*, Promotor, diferenciación, desarrollo

Departamento de Señalización Celular

Papel de la quinasa Akt/PKB en la supervivencia celular frente a neurotoxinas inductoras de estrés oxidativo. Aplicación en enfermedades neurodegenerativas.

Investigador principal	Cuadrado Pastor, Antonio, Profesor Titular UAM
Becarios	Martín Izquierdo, Daniel(desde 2000 hasta 2001)
Predotorales	Rojo Sanchís, Ana Isabel(desde octubre 2001 hasta 2001) Salinas La Rosa, Marta(desde 2000 hasta 2001)
Personal de Apoyo	López-Valdaliso, Raquel (desde 2000 hasta marzo 2000)
Estudiantes de Licenciatura	Valentín López, Olivia
Becarios FINNOVA	Nebot Hernandez, Carmen(2000)
Colaboraciones	Alvarez, Alberto. Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal. CSIC.(desde 2000 hasta 2001) Valdivieso, Fernando. Centro de Biología Molecular (UAM-CSIC)(desde 2000 hasta 2001) Lorenzo, Margarita. Dpto Bioquímica. Facultad de Farmacia. UCM (2001) Cavada, Carmen. Dpto. Morfología. Facultad Medicina. UAM Tabares, E. Dpto. Medicina Preventiva y Microbiología. Facultad de Medicina. UAM

Lineas de Investigación

Regulación de la actividad quinasa de Akt/PKB por ceramida.

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

La ceramida se acumula en las neuronas durante la apoptosis inducida por receptor, como p75NTR, o por estrés oxidativo. Sin embargo, su papel en la señalización de apoptosis permanece poco conocido. Nosotros hemos observado que el análogo permeable C2-ceramida inhibe la vía de señalización de NGF a nivel de la Ser/Thr quinasa Akt. Por el contrario la ceramida no inhibe significativamente otros elementos de la transducción de señales de NGF como ERK, PI 3 quinasa o PDK1 y no altera la translocación de estas quinasas a la membrana plasmática. Hemos observado que la inhibición de Akt se debe a la

defosforilación de dos residuos clave para su activación Thr 308 y Ser476. Además, Akt es defosforilada in vitro por una fosfatasa independiente de calcio que es activada por ceramida, CAPP(ceramide-activated protein phosphatase) que pertenece al grupo de las fosfatasas PP2A. Estos resultados indican que un papel importante de la ceramida durante la señalización apoptótica es la inhibición de la vía de supervivencia PI3K/Akt a nivel de Akt. Durante este estudio observamos que la versión constitutivamente activada de Akt, que posee una señal de miristilación y está permanentemente anclada a la membrana celular, es más resistente a defosforilación por CAPP y confiere resistencia frente a la apoptosis inducida por C2-ceramida.

Efecto neuroprotector de Akt/PKB frente a toxinas inductoras de Parkinson.

(M. Salinas, D. Martín, C. Nebot, A. Alvarez , A. Cuadrado)

La ruta de señalización de PI3 quinasa/Akt protege a las neuronas frente a diversos estímulos de stres que incluyen la deprivación de factores tróficos o radiación UV. Sin embargo su efecto protector frente a neurotoxinas que inducen estrés oxidativo ha sido muy poco analizado. Nosotros hemos estudiado el efecto apoptótico de la toxina parkinsoniana 1-metil-fenil piridinium (MPP+) en células dopaminérgicas PC12, procedentes de un feocromocitoma de rata. Hemos observado que la sobre-expresión de una proteína de fusión EGFP-Akt anclada a membrana por una señal de misitilación atenúa el efecto apoptótico de esta neurotoxina. La protección observada no se debe a un protección directa sobre el complejo I mitocondrial ni a la restauración de la carga energética celular. Por otra parte, las células que sobre-expresan esta proteína de fusión conservan el potencial de membrana mitocondrial razonablemente inalterado y niveles presentan más bajos de especies reactivas de oxígeno (ROS) que células control que sobre-expresan EGFP. Estos estudios han planteado por primera vez un nuevo sitio de acción de la quinasa Akt a nivel del la maquinaria de destoxificación oxidativa celular.

Efecto de los péptidos derivados de beta-amiloide sobre la actividad quinasa de Akt/PKB y la supervivencia celular

(D. Martín, M. Salinas, R. López-Valdaliso , F. Valdivieso , A. Cuadrado)

Dado que los estudios mencionados anteriormente indican que la quinasa Akt protege frente a la muerte neuronal causada por agentes oxidantes, hemos decidido analizar el papel de este quinasa frente al la muerte celular inducida por péptidos derivados de la proteína beta-amiloide. Esta proteina se acumula en las placas seniles del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y se ha propuesto que induce muerte neuronal mediante la producción de radicales libres

de oxígeno y peróxido de hidrógeno. Efectivamente, hemos observado que cuando las células PC12 son sometidas a concentraciones micromolares del péptido Ab(25-35) se produce un incremento en ROS y apoptosis. De nuevo, la versión constitutivamente activada de Akt atenúa significativamente la muerte celular inducida por este péptido y provoca una reducción de los niveles de ROS en comparación con células control transfectadas con EGFP.

Publicaciones

Salinas, M., López-Valdaliso, R., Martín, D., Alvarez, A., Cuadrado, A. (2000). Inhibition of PKB/Akt1 by C2-Ceramide Involves Activation of Ceramide-Activated Protein Phosphatase in PC12 Cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 15 156-169.

Salinas, M., Martín, D., Alvarez, A., Cuadrado, A. (2001). Akt1/PKB Protects PC12 Cells against the Parkinsonian-Inducing Neurotoxin 1-Methyl-4-phenylpyridinium and Reduces de Levels of Oxygen-Free Radicals. *Mol. Cell. Neurosci.* 17 67-77.

Martín, D., Salinas, M., Lopez-Valdaliso, R., Serrano, E., Recuero, M., Cuadrado, A. (2001). Effect of Alzheimer Amyloid Fragment A-beta(25-35) on Akt/PKB Kinase and Survival of PC12 Cells. *J. Neurochem.* 78 1000-1008.

Financiación

Papel de la quinasa Akt en la supervivencia neuronal inducida por neurotrofinas y receptores muscarínicos (*SAF98-015*) financiado por CICYT. Años 1998-2001

Palabras Clave

Akt/PKB, estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas

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

Investigador principal	Feliu Albiñana, Juan Emilio, Catedrático UAM
Investigadores	Benlloch Marín, Teresa
Asociados	Pediatra Especialista de Área
Investigadores	Sánchez Gutiérrez, Julio Cesar
Contratados	Investigador Contratado FIS
Becarios Postdoctorales	González Lechuga, M ^a del Carmen(desde octubre 2000) Salvatella Lezcano, María
Becarios Predoctorales	Carrillo de la Fuente, Juan José(hasta febrero 2001) Esteban Gamboa, Andrés Ibares Muñoz, Belén Parra Solis, Beatriz(hasta septiembre 2000) Díaz de Espada Bosch, Miguel
Estudiantes de Licenciatura	Díaz García, Vanesa(desde septiembre 2001)
Colaboraciones	Rossi Raviolo, Irma. Serv. Gastroenterología, Clínica Puerta de Hierro Bosch Tubert, Fátima. Catedr. Bioquímica, Univ. Autónoma de Barcelona

Lineas de Investigación

Diagnóstico bioquímico y genético-molecular de enfermedades hereditarias del metabolismo de los hidratos de carbono.

(J.C. Sánchez, T. Benlloch, J.E. Feliu)

En el grupo existe una Unidad de Investigación y Diagnóstico de Metabolopatías que viene funcionando como Laboratorio de Referencia para un gran número de hospitales de toda España en temas relacionados con el diagnóstico de glucogenosis, intolerancia a la fructosa y galactosemia. Entre los diagnósticos realizados en los últimos años se contabilizan más de un centenar de casos de glucogenosis (tipos I,II,III,V,VI y VII), 17 casos de intolerancia a la fructosa y 24 casos de galactosemia clásica. Desde hace tres años estamos desarrollando el

Proyecto de Investigación titulado "Intolerancia hereditaria a la fructosa y galactosemia clásica. Estudio genético molecular en familias españolas", cuyo objetivo principal es realizar un estudio familiar a nivel genético-molecular de los casos de intolerancia a la fructosa y galactosemia clásica ya diagnosticados por nuestra Unidad, con objeto de identificar el tipo de defecto molecular o mutación responsable. Asimismo, se está llevando a cabo un estudio familiar genético-molecular de la glucogenosis tipo Ia y de la glucogenosis tipo III en la población española.

Mecanismos moleculares de la resistencia a insulina.

(J.J. Carrillo, A. Esteban, B. Ibares, J.E. Feliu)

Esta línea de investigación, iniciada en 1987 ha permitido demostrar una serie de alteraciones en el sistema de señalización celular dependiente de glucosil-fosfatidilinositol en diferentes modelos animales de resistencia a insulina, tales como exceso de glucocorticoides, diabetes por administración de estreptozotocina, envejecimiento y obesidad genéticamente determinada (ratas Zucker obesas). Asimismo, en este último modelo de ratas obesas, hemos estudiado los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a insulina, glucosa y sulfonilureas que presenta la gluconeogénesis hepática en estos animales. En la actualidad, estamos estudiando los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a insulina a nivel hepático en respuesta a la leptina y al TNF α . Asimismo, estamos llevando a cabo un estudio, en colaboración con el equipo de investigación que dirige la Prof. Fátima Bosch en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona, sobre la influencia de la sobreexpresión de la proteína desacopladora UCP-2 en el hígado de ratones transgénicos en la aparición de obesidad y de resistencia a la insulina

Metabolismo en células gastrointestinales.

(M. Salvatella, Rossi Raviolo, Irma , J.E. Feliu)

Esta línea de trabajo, desarrollada en colaboración con la Dra. Irma Rossi del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, ha permitido estudiar la influencia del etanol y de diferentes antiinflamatorios no esteroideos sobre una serie de parámetros celulares implicados en el proceso de formación de ácido clorhídrico en glándulas gástricas aisladas y células parietales en cultivo, obtenidas de estómagos de conejo.

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

(M. Díaz de Espada, M.d.C. González, J.C. Sánchez, B. Parra, J.E. Feliu)

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

Publicaciones

Falta indicar los autores (2000). Modulation of gluconeogenesis by epinephrine in hepatocytes isolated from genetically obese (fa/fa) Zucker rats. Arch Biochem Biophys. 373 249-254.

Falta indicar los autores (2001). Resistance of hepatic gluconeogenesis to the inhibition by sulphonylureas in the genetically obese (fa/fa) rats. Life Sci. 68 1617-1628.

Falta indicar los autores (2001). Impairment of the H⁺,K⁺-ATPase-dependent proton transport and inhibition of gastric acid secretion by ethanol. Amer J Physiol. 280 G1331-G1340.

Falta indicar los autores (2001). : Involvement of both phosphatidylinositol 3-kinase and p44/42 mitogen-activated protein kinase pathways in the short-term regulation of pyruvate kinase-L by insulin. Endocrinology. 142 1057-1064.

Tesis Doctoral

Juan José Carrillo de la Fuente

"Título: Regulación por insulina de los enzimas claves de la vía glucolítica/gluconeogénica en cultivo primario de hepatocitos de rata obesa Zucker (fa/fa)". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2000. Director: Juan Emilio Feliu. Calificación: Apto "cum laude".

María Salvatella Lezcano

"Toxicidad inducida por etanol y antiinflamatorios no esteroideos en un modelo experimental de glándulas gástricas aisladas de conejo: mecanismos implicados". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2001. Director: Juan Emilio Feliu. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Animales transgénicos modelos de intolerancia hereditaria a la fructosa y de glucogenosis tipo VII" (99/0276) financiado por Fondo de Investigación Sanitaria. Años 1999-2001

Fisiopatología de la resistencia a insulina a nivel hepático:Papel de las proteínas IRS-1 e IRS-2 en las acciones metabólicas de esta hormona. (08.6/0018/1998) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 1999-2000

Animals transgenic models d'intolerancia a la fructosa i glucogenosi muscular (983530) financiado por Fundació LA MARATÓ de TV3. Años 1999-2001

Alteraciones metabólicas asociadas a la sobreexpresión del gen UCP2 en el hígado de ratones transgénicos (08.6/0015.1/2000) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 2000-2001

Estudio genético-molecular de la intolerancia a la fructosa, de la glucogenosis tipo Ia y de la glucogenosis tipo III en la población española (01/0225) financiado por Fondo de Investigación Sanitaria. Años 2001-2003

Patentes

"Gen quimérico que utiliza el gen o el cDNA de la fructokinasa y animal transgénico que expresa dicho gen quimérico para su utilización en el estudio de la intolerancia a la fructosa y en el desarrollo de aproximaciones terapéuticas a esta enfermedad"

P200002221

Palabras Clave

Metabolismo, Diabetes, Carbohidratos, Insulina, Glucogenosis, Intolerancia a la fructosa, Galactosemia

Mecanismos implicados en la progresión maligna de carcinomas

Investigador principal	Quintanilla Avila, Miguel, Investigador Científico
Investigadores Contratados	Iglesias Badiola, Maite (hasta septiembre 2000)
Becarios Postdoctorales	Gómez Scholl, Fco. Manuel(hasta agosto 2000) Frontelo Fernández, Pilar(hasta abril 2000)
Becarios Predoctorales	Romero Cliquet, Diana Pons Parra, Mar Martín Villar, Ester (desde septiembre 2000)
Personal de Apoyo	García-Gallo Pinto, Mónica(hasta diciembre 2000)
Estudiantes de Licenciatura	Pérez Gómez, Eduardo(desde julio 2001)
Colaboraciones	Gamallo, Carlos (Hptal de la Princesa, UAM, Madrid) Bernabeu, Carmelo (CIB, Madrid) Ramírez, Jose Ramón (Hptal Gómez-Ulla, Madrid) Cruces, Jesús (IIB, Madrid) Regadera, Javier (Fac. de Medicina de la UAM, Madrid) Bella, José (Fac. de Biología de la UAM, Madrid) Cruz, Juan (CNIO, Madrid) Díaz, Joaquín (ASAC Pharmaceutical International, Alicante) Muñoz, Alberto (IIB, Madrid)

Lineas de Investigación

TGF- β 1 como estimulador de la progresión maligna de carcinomas. Estudio de la interrelación entre las vías de señalización Smad y Ras/MAPK en células de carcinomas humanos.

(Romero D , Iglesias M , Frontelo P , Quintanilla M)

TGF- β 1 estimula las propiedades invasivas y metastásicas de las células de carcinoma. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que, en queratinocitos transformados de epidermis de ratón que expresan un oncogén Ras, el bloqueo funcional de Smad4 conduce a una hiperactivación constitutiva de la señalización via Ras/MAPK y a la progresión a carcinomas indiferenciados malignos, lo que sugiere una cooperación entre la activación oncogénica Ras y la inactivación del gen supresor Smad4 en la progresión maligna. Estamos

analizando esta interrelación en modelos de cáncer humano (colorectal y pancreático) que muestran alteraciones frecuentes en ambos genes. Para ello, hemos seleccionado las líneas celulares SW480 (K-Ras mut, Smad4-deficiente), derivada de un carcinoma de colon, y Panc1 (K-Ras mut, Smad 4 normal), derivada de un carcinoma pancreático. La expresión del cDNA silvestre de Smad4 en SW480 restaura la señalización de TGF- β vía Smad y disminuye la actividad de Ras (nivel de Ras-GTP) y ERK (P-ERK), confirmando la interacción entre las dos rutas también en células tumorales humanas. Experimentos similares se están realizando con transfectantes de Panc1 que expresan una forma truncada (dominante negativo) de Smad4.

Modelo celular para el estudio de la transición carcinoma epidermoide-carcinoma fusocelular

(Pons M , Bella J , Cruz J , Gamallo C , Quintanilla M)

La línea celular Car C, muy invasiva y metastásica, deriva de un carcinoma fusocelular inducido en la piel de un ratón mediante protocolos de carcinogénesis química. Hemos obtenido una variante, Car C-R, que presenta una morfología epitelial y una drástica disminución de su malignidad. A diferencia de Car C que es 100% tumorogénica, Car C-R sólo induce tumores en el 33% de los sitios de inyección. Sin embargo, el fenotipo de estos tumores es pobremente diferenciado, con menos del 5% de componente epitelial. Mediante el aislamiento, a partir de un tumor inducido por Car C-R, de clones de morfología epitelial y fibroblástica estamos analizando alteraciones cromosómicas (aneuploidia, translocaciones, ganancia/pérdida de cromosomas), así como el estado y la expresión de genes específicos (H-Ras y p15/p16) implicados en la transición carcinoma epidermoide-carcinoma fusocelular.

Implicación de endoglina (CD105), un co-receptor de TGF- β , en la carcinogénesis de piel de ratón

(Quintanilla M , Pérez E , Ramírez JR , Romero D , Bernabeu C)

Endoglina (CD105) es un co-receptor de TGF- β , cuya función no se conoce con exactitud. Endoglina se expresa abundantemente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y parece estar implicada en la angiogénesis. Nuestros estudios han puesto de manifiesto la presencia de endoglina en queratinocitos de los folículos pilosos y en células basales de la epidermis interfolicular, los dos compartimentos donde se cree residen las células dianas (stem cells) de la carcinogénesis epidérmica, así como en líneas celulares transformadas de epidermis de ratón. Para analizar la posible implicación de endoglina en la carcinogénesis de piel hemos realizado un estudio en ratones genéticamente

deficientes para el gen de endoglina (CD105+/-) mediante protocolos de iniciación/promoción tumoral con DMBA/TPA. Los ratones CD105+/- mostraron una drástica disminución de la incidencia de tumores en relación a los ratones control CD105+/+. Sin embargo, en los ratones CD105+/-, la progresión maligna estaba acelerada con la aparición temprana de múltiples carcinomas epidermoides, incluso pobremente diferenciados; un fenotipo idéntico al obtenido con ratones que sobreexpresan TGF- β 1 en la epidermis. Estos datos sugieren una función de endoglina en la homeostasis epidérmica y en la carcinogénesis de piel, probablemente modulando la señalización de TGF- β 1.

Caracterización del antígeno PA2.26, una nueva glicoproteína transmembrana asociada con el cáncer humano

(Martín-Villar E , Scholl FG , García-Gallo M , Regadera J , Cruces J , Gamallo C , Quintanilla M)

Nuestro laboratorio ha identificado una nueva glicoproteína transmembrana tipo mucina cuya expresión se induce en la carcinogénesis de piel de ratón, asociada con la migración celular y la metástasis. Recientemente, hemos aislado y caracterizado el cDNA que codifica la proteína PA2.26 humana. La obtención de un anticuerpo policlonal específico dirigido contra un péptido del dominio extracelular nos ha permitido analizar la expresión de PA2.26 en tejidos normales y tumorales humanos. Los resultados obtenidos son de un gran interés para la clínica: PA2.26 es un marcador específico de capilares linfáticos, que no se expresa en endotelios sanguíneos, y ha demostrado ser muy útil para analizar la vasculatura linfática, y la linfangiogénesis, en el cáncer. Por otro lado, PA2.26 se induce frecuentemente en células de carcinomas epidermoides de la cavidad oral (en las zonas de infiltración tumoral) y de piel, pero no en otros tipos de carcinomas (colon, gástrico, pulmón, páncreas, etc) o en melanomas. Estas observaciones sugieren que PA2.26 podría ser un marcador específico de malignidad en carcinomas epidermoides tanto murinos como humanos.

Análisis de la actividad antitumoral de compuestos aislados de plantas iberoamericanas

(Romero D , Díaz J , Quintanilla M)

Hace varios años que venimos colaborando con la empresa ASAC Pharmaceutical International (Alicante) en el aislamiento de sustancias de extractos de plantas iberoamericanas con actividad antitumoral. Estos estudios han conducido a la purificación de un compuesto que presentaba actividad anti-proliferativa in vitro e in vivo en células de carcinomas murinos y humanos, pero no en queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos. Hemos analizado el efecto anti-tumoral del

compuesto natural (aislado de la planta), y de compuestos obtenidos por síntesis química, sobre carcinomas inducidos en ratones SCID por trasplante de la línea tumoral humana A431. Los resultados obtenidos sugieren que tanto el compuesto natural como los compuestos de síntesis inhiben el crecimiento de los tumores y aumentan la supervivencia de los animales, sin efectos secundarios detectables.

Publicaciones

Quintanilla M , Frontelo P , Iglesias M (2000). Signaling during mouse skin tumor progression. *Electr. J. Pathol. Histol.* 6.1 001-012.

Santibáñez JF , Quintanilla M , Martínez J (2000). Genistein and curcumin block TGF- β 1-induced u-PA expression and migratory and invasive phenotype in mouse epidermal keratinocytes. *Nutr. Cancer.* 37 49-54.

Santibáñez JF , Iglesias M , Frontelo P , Martínez J , Quintanilla M (2000). Involvement of the Ras/MAPK signaling pathway in the modulation of urokinase production and cellular invasiveness by transforming growth factor β 1 in transformed keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* . 273 521-527.

Iglesias M , Frontelo P , Gamallo C , Quintanilla M (2000). Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene.* 19 4134-4145.

Scholl FG , Gamallo C , Quintanilla M (2000). Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab. Invest.* . 80 1749-1759.

Pálmer HG , González-Sancho JM , Espada J , Berciano MT , Puig I , Baulida J , Quintanilla M , Cano A , García de Herreros A , Lafarga M , Muñoz A (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154 369-387.

Financiación

Regulación del fenotipo migratorio e invasivo en células de carcinoma epidermoide. Papel de TGF- β 1 (*SAF98-0085-CO3-02*) financiado por CICYT. Años 1998-2001

Análisis del antígeno PA2.26, una nueva glicoproteína tipo mucina de la superficie celular, como marcador de la progresión tumoral en el cáncer humano (08.1/0021.1/99) financiado por CAM. Años 1999-2000

Caracterización molecular y funcional del antígeno PA2.26. Estudio de su implicación en el cáncer humano (01/1125) financiado por FIS. Años 2001-2003

Valoración de la acción antitumoral de sustancias y extractos obtenidos de plantas iberoamericanas financiado por ASAC Pharmaceutical International. Años 1999-2001

Palabras Clave

TGF- β 1, Smad4, ras, MAPK, Endoglin, PA2.26, carcinoma, progresión maligna

Estudio de las vías de señalización en estrés, diferenciación y apoptosis

Investigador principal	Renart Pita, Jaime (en comisión de servicios en la Comisión Europea desde febrero-2001), INV. Comisión Serv.
Investigadores Asociados	Fernández Martín, Margarita Profesora Titular, Departamento de Bioquímica de la UAM Díaz-Guerra González, Margarita Profesora Asociada, Departamento de Bioquímica de la UAM (hasta noviembre 2001)
Investigadores Contratados	Díaz-Guerra González, Margarita Investigadora contratada por el programa Ramón y Cajal (desde noviembre 2001)
Becarios	Agusti de Ciurana, M ^a Concepción en colaboración con el Departamento de XXX, Universidad Pública de Navarra
Predotorales	Cejas Guerrero, Paloma Departamento de Oncología Médica del Hospital "La Paz" Gascón Jiménez, Sergio (desde noviembre 2000) García-Gallo Pinto, Monica (hasta junio 2000) López Maderuelo, M ^a Dolores (hasta junio 2000) Rodríguez Navas, M ^a del Carmen (desde septiembre 2001)
Personal de Apoyo	Moratilla Lafuente, Carmen Domínguez, Carmen (hasta septiembre 2001)
Estudiantes de Licenciatura	Loeches, Maria de los Angeles (hasta julio 2000)
Colaboraciones	Castro, José María. Facultad de Veterinaria Universidad Complutense, Madrid Montiel, Carmen. Departamento de Farmacología y Terapéutica de la UAM Roda, José María, Unidad Cerebrovascular del Hospital La Paz Tabarés, Enrique. Departamento de Medicina Preventiva y Microbiología de la UAM

Lineas de Investigación

Regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en situaciones de estrés de retículo endoplásmico (RE)

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

La subunidad NR1, componente obligado del receptor NMDA, presenta características diferenciales en su regulación y transporte a la membrana respecto de las subunidades NR2. Utilizando un sistema heterólogo en el que las subunidades del receptor se expresan con ayuda del virus de la vacuna, hemos demostrado que NR1 sufre un proceso de maduración en sus carbohidratos de cinética lenta, de forma que la proteína inmadura es mucho menos estable que su forma madura o que la subunidad NR2A. Únicamente una fracción de la subunidad NR1 madura es capaz de interactuar con la subunidad NR2A. En el sistema heterólogo y en cultivos primarios de neuronas corticales de rata, la inhibición de la N-glicosilación, y la consecuente activación de respuestas de estrés de RE, da lugar a la degradación diferencial de la proteína NR1 no glicosilada. Estamos estudiando el papel de los carbohidratos unidos a NR1 y NR2A en el plegamiento y estabilidad de estas subunidades, así como su interacción con chaperonas del RE como BiP/grp78, calnexina y calreticulina.

Contribución de las respuestas de estrés de RE a la excitotoxicidad neuronal e isquemia cerebral

(S. Gascón, J. Renart, M. Díaz-Guerra)

La isquemia cerebral y la muerte neuronal que conlleva constituyen la base de patologías importantes del SNC como los accidentes cerebrovasculares. La reperfusión del tejido tras la hipoxia da lugar a fenómenos de degeneración neuronal retardada, por mecanismos que probablemente incluyen la muerte por excitotoxicidad. Esta se produce por estimulación excesiva de los receptores de glutamato tipo NMDA y alteración de la homeostasis celular del ion calcio. Una posibilidad es que la salida masiva de calcio almacenado en el RE ponga en marcha el programa de estrés celular propio de esta organela, que podría contribuir a la muerte celular por inducción de apoptosis. Estamos estudiando la activación de las respuestas de estrés de RE y su relación con la degradación de NR1, en cultivos de neuronas corticales tratados con NMDA y en un modelo animal de isquemia focal transitoria. Nos interesan especialmente los niveles y/o estado de activación de proteínas que participan en la apoptosis debida a estrés de esta organela: CHOP/GADD153, BiP/grp78, m-calpaina, y caspasa-12.

Señalización celular durante la apoptosis y diferenciación de células N2A

(M.D. Lopez-Maderuelo, M.d.C. Rodríguez, J. Renart, M. Fernández-Renart)

La supervivencia de neuronas inmaduras en diferenciación depende de la asequibilidad de factores neurotróficos. Estos factores activan distintas vías que permiten la supervivencia neuronal. Dos de las vías más relevantes son las que llevan a la activación de las kinasas ERK y Akt. Se ha propuesto que la activación

de estas vías conduce a la fosforilación e inactivación de proteínas apoptóticas. . Las células de neuroblastoma murino N2A diferencian emitiendo neuritas tras aproximadamente 24 h de ayuno de suero, aunque el mantenimiento del ayuno por periodos más largos (48-72 hr) lleva a apoptosis. Si las células se tratan con inhibidores de PKC, la apoptosis se acelera de forma considerable, sugiriendo que la inhibición de PKC afecta drásticamente alguna(s) vía(s) de supervivencia. En una línea celular derivada que sobreexpresa el gen antiapoptótico Bcl-2 el mismo estímulo no produce apoptosis. Utilizando ambas líneas celulares, estamos estudiando el papel que juegan las MAP quinasas ERK, JNK y p38, junto con la quinasa Akt y la activación del factor de transcripción NFκB, en la apoptosis promovida por inhibición de PKC, asimismo estamos estudiando la implicación de algunas de estas quinasas en el ciclo celular y la posible interrelación entre algunas de estas vías. Usando el mismo modelo experimental estamos estudiando así mismo el papel de estas vías en la diferenciación celular.

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

(P. Cejas, J. Renart)

El TNF alfa es una citoquina con un amplio espectro de acciones, habiéndose descrito tanto la inducción de apoptosis como la protección de muerte celular mediada por la activación de NFκB. Para estudiar este comportamiento aparentemente contradictorio, estamos tratando de identificar los genes que se inducen en células N2A al ser tratadas con TNF alfa, mediante la técnica de SAGE, que permite un análisis global de genes tanto inducidos como reprimidos en una situación fisiológica frente a una situación control. El método consiste en aislar e identificar regiones de 10bp (tags) específicos de cada gen; su mayor o menor frecuencia indican la mayor o menor abundancia del mRNA correspondiente en una u otra situación fisiológica. Este método de alto rendimiento puede utilizarse para identificar el transcriptoma celular (conjunto de todos los genes expresados por un tipo celular en una situación definida). Después del adecuado análisis bioinformático y estadístico, hemos identificado 28 genes que están regulados por TNF alfa en estas células. Los cambios en la expresión de algunos de estos genes se han comprobado mediante hibridación con mRNAs. Uno de ellos es el de la Fosfolípido hidroperóxido Glutathione peroxidasa IV (PH-GPx4), gen poco estudiado y para el que se dispone de pocas herramientas. Para estudiar la regulación de su expresión por TNF alfa, estamos haciendo construcciones del promotor de GPx4 con el gen reportero luciferasa. El hecho de encontrar que TNF alfa induce PH-GPx4 refuerza la hipótesis del papel protector de TNF alfa frente a la apoptosis, ya que esta proteína está implicada en la

protección de membranas celulares frente a ataques de especies reactivas de oxígeno.

Publicaciones

Moreno-bueno, G., Calés, C., Behrens, M.M., Fernández-Renart, M. (2000). Isolation and characterization of casein kinase 1 from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 349 527-537.

García-Palomero, E., Montiel, C., Herrero, C.J., García, A.G., Alvarez, R.M., Arnalich, F.M., Renart, J., Hernan Lara, H., Cardenas, A.M. (2000). Multiple calcium pathways induce the expression of SNAP-25 protein in chromaffin cells. *J. Neurochem.* 74 1049-1058.

Arnalich, F., García-Palomero, E., López, J., Jiménez, M., Madero, R., Renart, J., Vázquez, J.J., Montiel, C. (2000). Predictive value of Nuclear Factor-kB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infection and Immunity.* 68 1942-1945.

García-Gallo, M , Renart, J., Díaz-Guerra, M. (2001). The NR1 subunit of the N-Methyl-D-Aspartate receptor can be efficiently expressed alone in the cell surface of mammalian cells and is required for the transport of the NR2A subunit. *Biochem. J.* 356 539-547.

Lopez-Maderuelo, M.D., Fernández-Renart, M., Moratilla, C., Renart, J. (2001). Opposite effects of the hsp90 inhibitor geldanamycin: induction of apoptosis in PC12, and differentiation in N2A cells. *FEBS Lett.* 490 23-27.

García-Palomero, E., Renart, J., Andrés-Mateos, E., Solís-Garrido, E.L., Matute, C., Herrero C.J., García, A.G. , Montiel, C. (2001). Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroendocrinology.* 74 251-261.

Tesis Doctoral

M^a Dolores López Maderuelo

"Papel de las actividades MAPK (ERK y JNK) en procesos de diferenciación y apoptosis en células de neuroblastoma N2A". Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2000. Director: Jaime Renart. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Mónica García-Gallo

"Efecto de la inhibición de la N-glicosilación en la funcionalidad del receptor de glutamato tipo NMDA: activación de vías de estrés del retículo endoplásmico".
Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2000. Director: Jaime Renart. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Financiación

Aislamiento e identificación de genes implicados en apoptosis y excitotoxicidad en líneas neuronales (*SAF97-0163*) financiado por CICYT. Años 1997-2000

Mecanismos bioquímicos y moleculares en la señalización del estrés, la diferenciación y la muerte celular (*PM99-0115*) financiado por Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Años 2000-2003

Palabras Clave

Apoptosis, Diferenciación, Receptores del glutamato, Estrés del RE, MAP kinasas, Akt, Excitotoxicidad

Bases moleculares de la diferenciación oligodendroglial

Investigador principal	Rodríguez Peña, María Angeles, CTIT Comision Serv.
Investigadores Contratados	Iglesias Vacas, Teresa(desde junio 1999 hasta marzo 2000)
Investigadores Visitantes	Regine Hepp (desde marzo 2000 hasta abril 2000) Dominique Baas (desde octubre 2001 hasta noviembre 2001) Nigel Pringle (desde 2000 hasta febrero 2000)
Becarios Predoctorales	Espliguero García, Gemma Porlan Alonso, Eva
Personal de Apoyo	Moya Alonso, Miguel Angel(hasta julio 2000) de la Peña Martín, Gema (hasta septiembre 2001)
Estudiantes de Licenciatura	María Vías (desde octubre 2000 hasta julio 2001) Deogracias Pastor, Rubén(desde octubre 2001)
Colaboraciones	Prof. Louis L. Sarlieve (CMRS-UP416. Estrasburgo)(hasta 2001) Jacques Samarut (ANIMAGE, Lyon) William Richardson. Wolfson Inst. Biomed. Res. , Londres) Michel Mallat (INSERM-495, Paris)

Lineas de Investigación

Efecto antiproliferativo de la expresión de las isoformas alfa y beta del receptor de hormona tiroidea

(S. Vega, E. Porlan, A. Rodriguez-Peña)

La expresión de las diferentes isoformas del receptor en el linaje de oligodendrocitos es secuencial. Los precursores de oligodendrocitos expresan las isoformas alfa y durante el proceso de diferenciación se produce la co-expresión de la isoforma beta. Con el fin de estudiar una posible especificidad de isoforma en los efectos de la hormona tiroidea se procedió a expresar cada una de ellas en la línea de fibroblastos de ratón Swiss 3T3 utilizando vectores retrovirales estables e inducibles. Observamos que la expresión del receptor beta disminuía la capacidad proliferativa de dichas células de forma específica. Este efecto parece estar mediado por una disminución de la actividad cdk2.

Análisis de los elementos reguladores de la expresión del gen *trkB*

(G. Espliguero, R. Deogracias)

Nuestro grupo ha caracterizado las secuencias promotoras del gen *trkB*, y demostrado que su expresión está regulada por la hormona tiroidea y su receptor durante el desarrollo cerebral de mamíferos. Así mismo hemos observado que en cultivos primarios de neuronas y astrocitos se estimula la expresión de dicho gen tras el aumento del segundo mensajero, AMPc. Se han localizado dos elementos contiguos de respuesta a AMPc (CREs), de los cuales sólo uno de ellos es funcional y responsable de dicha activación. Esta secuencia une de forma específica CREB presentes en extractos nucleares y es capaz de conferir a un promotor heterólogo la capacidad de responder a un aumento de AMPc.

Análisis de la generación de oligodendrocitos en ratones transgénicos con inactivación de las diferentes isoformas del receptor de hormona tiroidea

(G. Espliguero, A. Rodríguez-Peña)

Se ha procedido a estudiar el linaje de oligodendrocitos, mediante marcadores específicos y técnicas de hibridación *in situ*, durante el desarrollo de la médula espinal en los tres tipos de ratones siguientes: ratones salvajes (wt), ratones con inactivación de las isoformas alfa del receptor (TR α 0/0) o ratones con inactivación de las isoformas beta (TR β -/-). La falta de la isoforma beta produce un aumento dramático del número de oligodendrocitos diferenciados. Este efecto es transitorio y sólo detectable durante las 24 horas previas al nacimiento que es cuando se detectan los primeros oligodendrocitos. Sin embargo, la falta de una u otra isoforma de los receptores no afecta a la secuencia temporal y espacial de aparición de los primeros precursores de oligodendrocitos, ni a su número, ni a su distribución. En los ratones salvajes y TR α 0/0, la falta de hormona tiroidea produce el mismo fenotipo que la falta de isoforma beta, indicando que el efecto de la hormona está mediado por la isoforma beta. Este efecto sobre la diferenciación de los oligodendrocitos es totalmente inesperado y pone de manifiesto un nuevo efecto de la hormona sobre este linaje y la importancia de la isoforma beta en dicho proceso.

Desarrollo microglial en ausencia de los receptores de hormona tiroidea

(E. Porlan, G. Espliguero, A. Rodríguez-Peña, Michel Mallat)

Recientemente se ha demostrado que la hormona tiroidea regula el desarrollo microglial. *In vitro*, estas células expresan tanto la isoforma alfa como la beta, pero se desconoce la contribución de cada una de ellas en este proceso. Hemos analizado el desarrollo de la microglía en ratones con inactivación de las isoformas alfa o beta, comparándolos con los ratones salvajes. La falta de una

isoforma parece ser compensada por la otra durante el desarrollo postnatal, ya que no existen diferencias en cuanto al número o distribución de células microgliales. Sin embargo, hemos observado que la falta de las isoformas alfa modifica de forma transitoria pero significativa la morfología de éstas células y la respuesta microglial tras la inyección con LPS.

Publicaciones

Meng, K., Rodriguez-Peña, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., Deuel, T.F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 2603-2608.

Pombo, P.M., Baretino, D., Espliguero, G., Metsis, M., Iglesias, T., Rodriguez-Peña, A. (2000). Transcriptional repression of neurotrophin receptor trkB by thyroid hormone in the developing rat brain. *J. Biol. Chem.* 275 37510-37517.

Vallejo, C.G., Escriva, H., Rodriguez-Peña, A. (2000). Evidence of tissue-specific, post-transcriptional regulation of NRF-2 expression. *Biochimie.* 82 1129-1133.

Hepp, R., Grant, N.J., Espliguero, G., Aunis, D., Sarlieve, L.L., Rodriguez-Peña, A., Langley, K. (2001). Adrenal gland SNAP-25 expression is altered in thyroid hormone knock-out mice. *Neuroreport.* 12 1427-1430.

Bury, F., Carre, J.L., Vega, S., Ghandour, M.S., Rodriguez-Peña, A., Langley, K., Sarlieve, L.L. (2001). Coexpression of thyroid hormone receptor isoforms in mouse oligodendrocytes. *J. Neurosc. Res.* 67 106-113.

Tesis Doctoral

Sonia Vega de los Reyes

"Mecanismo de la hormona tiroidea sobre la proliferación y diferenciación celulares". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2000. Director: María Angeles Rodríguez. Calificación: Apto "cum laude".

Financiación

Regulación fisiológica de la mielinización (*PM97-0066*) financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología. Años 1998-2001

Pleiotrofina, un efector angiogénico responsable del desarrollo tumoral maligno (*CAM 08.1/0020/99*) financiado por Comunidad Autónoma de Madrid. Años 2000-2001

Palabras Clave

receptores nucleares, oligodendrocito, diferenciación, microglía, gen *trkB*, desarrollo cerebral

Neurodegeneración auditiva: tras un modelo de neuroprotección por IGF-1

Investigador principal	Varela Nieto, Isabel, Investigador Científico
Investigadores Asociados	Contreras Rodríguez, Julio Profesor asociado, Facultad de Veterinaria UCM (desde junio 2000) León Alvarez, Yolanda profesor asociado UAM (desde 2001)
Investigadores Contratados	Balboa García, M ^a Angeles(desde 2000 hasta enero 2001)
Investigadores Visitantes	Paniagua Pardo, Miguel Angel Properzi , Francesca(enero 2000)
Becarios Predoctorales	Camarero Calderón, Guadalupe becaria MEC asociada a proyecto (desde 1997 hasta enero 2001) Cañón Sánchez, Susana Becaria CM (desde 1997) Conejero Hall, Laura becaria industria farmacéutica (desde 2001) Gorospe Ugalde, Itziar Becaria predoctoral del Gobierno Vasco-Eusko Jauriaritza (desde 2001) Pañeda Vazquez-Prada, Covadonga becaria industria e industria-CSIC (desde 1998 hasta enero 2001) Vigil Cuesta, Patricia beca FPI asociada a proyecto (desde enero 2001) Villar Nuñez, M ^a Angeles beca FPI asociada a proyecto (desde junio 2000 hasta noviembre 2001)
Personal de Apoyo	Coronado de la Osa, Vanesa Rozalen Rodrigo, Ana Isabel
Estudiantes de Licenciatura	Corcuera Sánchez, Susana García-Bermejo García, Clara Lopera Quijada, M ^a José López-Arcas Calleja, José María Mastro, Ignacio Sánchez Galiano, Susana
Becarios FINNOVA	Montes Jimenez, Luis Carlos
Colaboraciones	Markus Hartl (Innsbruck) Domingos Henrique (Lisboa) Fernando Giraldez (Barcelona) Enrique de la Rosa (Madrid)

Flora de Pablo (Madrid)
Carlos Avendaño (Madrid)
Isabel Fabregat (Madrid)

Lineas de Investigación

Neurodegeneración auditiva: tras un modelo de neuroprotección con IGF-1

(Todo el grupo)

La hipoacusia moderada o severa es uno de los problemas médicos con mayor prevalencia. Se estima que hasta un 6% de la población del mundo desarrollado padece esta enfermedad cuyos índices se prevé que aumenten debido al ruido y a otros factores externos. En España nacen 200 sordos profundos cada año y mas de millón y medio de personas padecen problemas auditivos crónicos de mayor o menor grado.

Durante los dos últimos años nos propusimos estudiar la relación existente entre el IGF-1 y la degeneración auditiva mediante tres aproximaciones complementarias: 1) El análisis de las dianas moleculares del IGF-1, siguiendo la expresión de marcadores de diferenciación neuronal, proliferación celular y otros en el oído de los ratones mutantes nulos IGF-1 (-/-). 2) El análisis del fenotipo del déficit moderado de IGF-1 en los ratones nulos y en los heterocigotos IGF-1 (+/-), los cuales proponemos como sistema modelo para estudiar el proceso de hipoacusia degenerativa y de ensayo para evaluar el impacto de las agresiones ambientales y de la ototoxicidad farmacológica. 3) Explorar las redes intracelulares de señalización que participan en el control de la neurogénesis temprana del oído interno en el embrión de pollo.

En forma breve, hemos descrito que el ratón deficiente en IGF-1 presenta alteraciones en la maduración postnatal del oído acompañadas de una pérdida progresiva de neuronas cocleares que avanza con la edad y que se evidencia en el ratón heterocigoto a edades más avanzadas. El IGF-1 es un factor fundamental para la supervivencia de estas neuronas en el ratón y en el embrión de pollo. En este modelo hemos explorado la relación existente entre las vías de supervivencia y muerte celular, en el balance final es fundamental la relación entre NGF(p75) e IGF-1(IGFR-1) que controlan conjuntamente los niveles de mediadores lipídicos (ceramida), la activación de proteasas (caspasa-3) y de quinasas (Raf y Akt).

En conjunto, nuestro trabajo ha contribuido a definir las bases moleculares y celulares de la degeneración auditiva y ahora nos proponemos investigar el potencial neuroprotector del IGF-1, que muestra las propiedades de un neuroprotector con una potencial utilidad clínica.

El metabolismo de la metionina en el control de la proliferación hepática

(Covadonga Pañeda e Isabel Varela Nieto)

Durante el desarrollo fetal el hígado expresa formas específicas de algunas enzimas, entre ellas la encargada de la síntesis de la S-adenosilmetionina (MAT). La expresión de la MAT fetal aumenta durante la regeneración hepática y en líneas celulares de hepatoma. Hemos estudiado la regulación de la expresión de ambas MAT por factores de crecimiento y sus vías intracelulares de señalización, así como los niveles relativos de ambas isoformas durante la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. Nuestros datos indican que la MAT fetal es indispensable para la proliferación hepática, estando sus niveles regulados por citoquinas y HGF. La relación entre ambas isoformas es un índice de la progresión de la regeneración hepática, así como del grado de transformación celular.

Publicaciones

Frago L et al (2000). Frago L.M., Camarero G., Cañón S., Pañeda C., Sanz C., León Y., Giráldez F., Varela-Nieto I. “Role of diffusible and transcription factors in inner ear development: Implications in regeneration” . *Histol. Histopathol.* 15 657-555.

Pañeda C. et al. (2000). Pañeda C, Frago LM, Fabregat I, Varela-Nieto I. “Modulation of methionine adenosyltransferases by ceramide, cytokines and growth factors.” ISBN: 84-930258-5-2. En: libro. Ed. Master Line, Madrid,

Frago L et al. (2001). Frago LM, Pañeda C, Fabregat I, Varela-Nieto I “Short chain ceramide regulates hepatic Methionine adenosyltransferase expression” . . *J. Hepatol.* 34 (2) 192-201.

Pañeda C. et al. (2001). Pañeda C., Villar A.V., Alonso A., Goñi F.M., Varela F., Brodbeck U., León,Y., Varela-Nieto I, Jones D.R. “Purification and characterization of insulin-mimetic inositol phosphoglycan-like molecules from *Lathyrus sativus* seeds”. *Mol. Medicine.* 7 454-460.

Pimentel B et al. (2000). C-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. Pimentel, B., Sanz, C., Rapp, U., Varela-Nieto, I., de Pablo, F. and de la Rosa, E. . *J. Neurosci.* 20 3254-3252.

Colombaioni L. et al. (2001). Serum deprivation increases ceramide levels and induces apoptosis in undifferentiated HN9.10e cells. Colombaioni L., Frago LM., Varela-Nieto I., Pesi R. and Garcia-Gil M. . Neurochem. Int. . 1132 1-10.

Camarero G et al. (2001). Inner ear delayed development and neuronal loss in Igf-1 deficient mice. Camarero G., Avendaño C., Fernández C., Villar MA., Contreras J., de Pablo F., Pichel J. and Varela-Nieto, I. . J. Neurosci. . 21 7630-7641.

Tesis Doctoral

Guadalupe Camarero Calderón Camarero Calderón, Guadalupe

"Papel del IGF-1 en la organogénesis temprana del oído interno y en la diferenciación y maduración postnatal del receptor auditivo". UAM. Facultad de Medicina. 2001. Director: Isabel Varela. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Pañeda Vázquez de Prada, Covadonga

"Regulación de la expresión de las isoenzimas de la MAT en la regeneración hepática, en el hígado fetal y en el hepatoma H35". UAM. Facultad de Medicina. 2000. Director: Isabel Varela. Calificación: Sobresaliente "cum laude".

Tesis de Licenciatura

Lopera Quijada, M Jose

"Efecto de la sobreexpresión del IGF-I en fibroblastos embrionarios y en el otocisto en aves". UAM. Facultad de Ciencias. 2000. Director: Isabel Varela. Calificación: Sobresaliente.

Financiación

Programa de Salud: Posible efecto protector de la S-Adenosil metionina (AdoMet) en un modelo de isquemia reperfusión hepática. financiado por Proyecto de la Comunidad de Madrid.. Años 2000-2000

Factores difusibles y mecanismos de transducción de señales que participan en el control de la organogénesis del oído interno: regulación de la muerte celular por apoptosis. (*Proyecto PGC PM99-0111*) financiado por CICYT. Años 2000-2003

Factores neurotróficos y redes de señalización en el desarrollo del oído interno.
Duración tres años (2002-2005). (*Proyecto BMC2001-2132-C02-02*) financiado
por CICYT. Años 2002-2005

Palabras Clave

Oído interno, neurodegeneración, neurogénesis, apoptosis, IGF-1, NGF

Seminarios 2000 / 2001

Seminarios celebrados en el año 2000 (orden cronológico)

Conferenciante	Centro	Título
Marcos Malumbres	Centro Nacional de Inv. Oncológicas Carlos III. Madrid y N. York Univ. Medical Center	Ras y modulación del ciclo celular en proliferación y senescencia
Carlos Belmonte	Instituto de Neurociencias (Alicante)	Detección periférica de estímulos dolorosos
Jose M ^a Delgado	Dpto. de Fisiología Animal. Lab. de Neurociencias. Facultad de Biología. Univ. Sevilla	La cara como espejo del alma. Un estudio de la fisiología del sistema motor facial
Carsten Carlberg	Universidad de Dusseldorf (Alemania)	Mechanisms of gene regulation by vitamin D and its analogs
Ana M ^a Gómez Foix	Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Univ. Barcelona	La transferencia de glucokinasa hepática al músculo esquelético mediada por adenovirus revela la contribución de la fosforilación muscular de la glucosa en el control de la glucemia.
Vicente Felipo	Inst. Invest. Citológicas de la Consejería de Salud de la Generalitat Valenciana	Alteraciones de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en cerebro <i>in vivo</i> en hiperamonemia y en fallo hepático, Implicaciones neurológicas.
Jose M. García-Verdugo	Facultad de Biología. Univ. de Valencia	Neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos: Identificación de células madre
Teresa Iglesias	Imperial Cancer Research Foundation (Londres) e Inst. Inv. Biomédicas	Protein Kinasa D (PKD): Aventuras y desventuras de una kinasa adoptada por la familia de las PKCs
Ignacio Pérez-Roger	Growth Control and Development Laboratory, ICRF (Londres) e Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)	Myc, ciclinas e inhibidores de CDKs: regulación de la entrada en el ciclo celular
Gustavo Egea	Dpto. de Biología Celular. Facultad de Medicina. Univ. Barcelona	Interacción de los microfilamentos de actina con el complejo de Golgi: implicaciones morfofuncionales en el tráfico intracelular de membranas.
Mario Vallejo	Inst. Invest. Biomédicas "Alberto Sols"	Regulación de la expresión génica por los factores de transcripción tipo homeodominio en el sistema nervioso central embrionario

German Rivas	Centro de Investigaciones Biológicas -CSIC	Asociaciones de proteínas del citoesqueleto y adhesión celular con interés farmacológico. Efectos de condiciones de aglomeración macromolecular semejantes a las fisiológicas
Pascual Sanz	Inst. Inv. Biomédicas Valencia (CSIC)	Bases moleculares del proceso de señalización por glucosa en levadura
Miguel Chillón Rodríguez	Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Univ. Autónoma	Vectores adenovirales para terapia génica en pulmón y cerebro
Augusto Silva	Centro de Investigaciones Biológicas -CSIC	Cáncer, p53 y apoptosis. Estudio en dos modelos experimentales y en patología humana
Angels Fabra	Dpto. Cáncer y Metástasis. Inst. Recerca Oncologica (IRO). Barcelona	Genes metastáticos: ¿Cuáles, cuándo y dónde?
Belén Peral	Lab. Neurología. Fund. Jiménez Díaz (Madrid) e Inst. Inv. Biomédicas (IIB)	Genética de las epilepsias con un modo de herencia complejo: caracterización de una translocación en una familia con epilepsia idiopática generalizada
A. Sibirny	Instituto Biología Molecular. Aviv, Ucrania	Catabolite regulation and peroxisome autophagy in methylotrophic yeasts
Jorge Laborda	Facultad de Medicina de Albacete. Univ. Castilla-la Mancha	Control de la diferenciación celular por el gen homeótico EFG dlk
José A. Carrodegua	Department of Pharmacological Sciences SUNY at Stony Brook, USA	De traducción a replicación: el factor de procesividad de la DNA polimerasa mitocondrial
Juan Lerma	Instituto Cajal (CSIC)	Implicaciones fisiopatológicas de los receptores de kainato neuronales
C. Hirschberg	Dpto. Molecular and Cellular Biology	Novel regulation of posttranslational modifications in higher and lower eukaryotes
Amancio Carnero	Wolson Institute for Biomedical Research. Univ. College. London	Senescencia replicativa e inmortalización celular: un abordaje genético
Abelardo López-Rivas	Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. Granada (CSIC)	Regulación de la expresión y la función de receptores de muerte celular en células tumorales
Yoshihiro Urade	Osaka Bioscience Institute, Osaka (Japón)	Prostaglandina D Synthase - Structure and Function
Jose Vicente Castell	Dpto. de Bioquímica. Fac. Medicina. Centro Investigación Hospital Univ. La Fe (Valencia)	El metabolismo hepático de los medicamentos por el citocromo p450. ¿Porqué existen diferencias entre los seres humanos? ¿Es posible anticipar las consecuencias?

Victor de Lorenzo	Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)	Secreción in situ de anticuerpos recombinantes por Escherichia coli: bacterias contra virus en el intestino animal
Gustavo Senaim	Inst. Biología Exp. Univ. Central Venezuela. Caracas	Los esfingolípidos y el diacilglicerol como nuevos moduladores de la Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.
Alfonsina Ramundo-Orlando	Institute of Experimental Medicina, CNR. Rome. Italy	Gap junction channels reconstituted in liposomes exposed to low-frequency electromagnetic fields
Juan Valcarcel	EMBL. Heidelberg. Alemania	Sexo, apoptosis y procesamiento alternativo de pre-mRNAs
Sabine Kafert	Zentrum für Sep therapie Roche Diagnostics GMBH und Medizinischen Hochschule Hannover Germany	Signal transduction by natural and experimental variants of the human GM-CSF receptor
Luis del Peso	Dept. Inmunología. Hospital de la Princesa (Madrid)	Transduccion de señales en apoptosis
Miguel Marín Padilla	Univ. de Dartmouth. EEUU	Desarrollo de la corteza cerebral
Paloma Pérez	Dep. Biología Molecular y Celular. CIEMAT (Madrid)	Displasia ectodérmica, aplasia cutis congénita y síndrome de malformación en transgénicos que sobreexpresan el receptor de glucocorticoides
Leoncio Garrido	Massachussets General Hospital y Centro Nacional de Química Orgánica. CSIC	Caracterización de la microcirculación en cáncer de mama con resonancia magnética
Damián García-Olmo	Hospital la Paz	Papel del DNA circulante en sangre en el cáncer colorrectal. La hipótesis de las genometástasis
Custodia García-Jiménez	Marie Curie Research Institute, the Chart, Surrey, UK.	hCHRAC, un completo remodelador de cromatina: localización subcelular e implicaciones funcionales
Enrique de la Rosa	Centro de Investigaciones Biológicas -CSIC	Muerte celular programada durante el desarrollo temprano del sistema nervioso
Jesús Mendieta	Departamento de Farmacología. Fac. Medicina. Univ. Alcalá	Dinámica molecular del dominio celular del receptor del glutamato
Jose Ramón Naranjo	Centro Nacional de Biotecnología -CSIC	Regulación por interacciones proteína-proteína del represor transcripcional DREAM
Jorge Ferrer	Inst. d'Investigacions Biomediques Pi i Sunyer. SERv. Endocrinología Hospital Clinic Univ. Barcelona	Hepatic Nuclear Factor 1-alpha, un regulador transcripcional del páncreas endocrino

Francisco José Iborra Oxford University

La síntesis de proteínas está acoplada a la transcripción en el núcleo de las células de mamíferos

Seminarios celebrados en el año 2001 (orden cronológico)

Conferenciante	Centro	Título
Manuel Guzmán	Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. F. de Biológicas	Efecto antiproliferativo de los cannabinoides
Elisa Martí	Instituto Cajal. CSIC	Sonic hedgehog y matriz extracelular en la generación de neuronas
Ginés Morata	Centro de Biología Molecular-CSIC/UAM	Subdominios genéticos en el cuerpo del <i>Drosophila</i>
José Pontón	Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Univ. País Vasco	Papel de los anticuerpos en las infecciones por <i>Candida</i> .
Colin Goding	Marie Curie Research Institute. The Chart. Gran Bretaña	The role of histone acetylation and chromatin remodeling in control of transcripcion in vivo
Cristina Miner	Inst. Biología y Genética Molecular – IBGM/CSIC/Univ. Valladolid	Mutaciones en BRCA1/2 en cáncer de mama hereditario: un estudio en Castilla y León
Jesús Plá	Dpto. de Microbiología. Fac. de Farmacia. Univ. Complutense. Madrid	Ruta HOG en <i>Candida albicans</i> : viejas y nuevas funciones
Kenneth Zaret	Fox Chase Cáncer Center Philadelphia. PA (USA)	Opening chromatin in early development
Alberto Ferrús	Inst. Cajal. CSIC	Nuevos factores de transcripción de <i>Drosophila</i>
Gerald Van de Werve	Departement de Nutrition, Faculte de Medecine, Univ. Montreal	Diabetes and hypophosphatemia upregulate the liver glucose 6-phosphatase system
Oliver Vicent	Centro de Investigaciones Biológicas -CSIC	Regulación del factor de transcripción Sip4 por la kinasa Snf1: un modelo para el estudio de la respuesta a glucosa en levadura
Margarita Lorenzo	Departamento de Bioquímica y Biología Mol. Facultad de Farmacia. Univ. Complutense	Efectos de las ceramidas sobre el transporte de glucosa insulina-dependiente y la supervivencia celular: implicación de AKT
Jose M ^a Mato	División de Hepatología y Terapia Génica. Fac. Medicina. Univ. De Navarra. Pamplona	Predisposición a desarrollar lesión hepática en ratones MAT1A Knockout
Meter L. Jorgensen	Copenhagen Univ. (Dinamarca)	Structure of cation sites in Na/K-ATPase of mammalian kidney and in salt gland of <i>Artemia salina</i>
Juan Luis Encinas	Director General de Amersham Iberica	Características generales de la investigación en la industria farmacéutica

Juan Pablo Albar	Centro Nacional de Biotecnología - CSIC	Proteómica una nueva estrategia para la identificación y caracterización de proteínas
Domingos Enrique	Inst. Histología e Embriología. Faculdade de Medicina de Lisboa (Portugal)	Cell polarity and cell fate in the chick neural tube
Joaquín Ariño	Dept. De Bioquímica. Fac. Veterinaria. Univ. Autónoma Barcelona	Funciones y utilidades de Ser/Thr fosfatasas: el caso de las Ppz de levadura
Flora de Pablo	Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC	Redes de factores señalizadores en el desarrollo: el IGF-I y sus relaciones
Carlos Vicario Abejón	Centro Investigaciones Biológicas - CSIC	El IGF-I es un factor esencial para el desarrollo de neuronas y glía del bulbo olfatorio
Margarita Lorenzo	Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Univ. Complutense	Señalización diferencial de la insulina en el desarrollo del músculo esquelético
Isabel Varela Nieto	Instituto de Investigaciones Biomédicas. CSIC/UAM	Funciones del factor trófico IGF-I durante el desarrollo del oído interno
Ignacio Torres Alemán	Inst. Neuro. R. Cajal. CSIC	Neuroprotección por IGF-I
Luis M. García-Segura	Inst. Neuro. R. Cajal. CSIC	Interacción entre receptores de estrógeno y receptor de IGF-I en neuroprotección
José M. Carrascosa	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa - CSIC/UAM	Desarrollo de resistencia a insulina y a leptina con el envejecimiento.
Ana Martínez-Hortigüela	Roche Molecular Biochemicals	Desarrollo y validación de un método para cuantificación de IGF-1 mediante RT-PCR cuantitativo y utilización de estándares externos
Charles J. Lowenstein	Johns Hopkins Medical Institutions. Baltimore, EEUU	The Anti-Viral role of Nitric Oxide
Ana Martínez-Hortigüela	Roche Molecular Biochemicals.	Sistema LightCycler: cuantificación de ácidos nucleicos y análisis de mutaciones en tiempo real. Aplicaciones en investigación y diagnóstico.
Miguel Campanero	Dpto. de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).	Regulación de la actividad de E2F en células de mamíferos
Santos Mañes	Dpto. de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)	Control de la direccionalidad del movimiento
M ^a Teresa Pérez-García	Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina. Valladolid	Canales de potasio sensibles a oxígeno en células quimiorreceptoras

Miguel A. Vega	Serv. de Bioquímica- Investigación. Hospital Ramón y Cajal	Aterosclerosis y CD36
José A. Carrodegua	Department of Pharmacological Sciences. Suny at Stony Brook	Subunidad accesoria de la DNA polimerasa mitocondrial: estructura, función y relación con las aminoacil tRNA sintetasas
Daniel Ramón	IATA (Valencia)	Aplicaciones de biotecnología a la nueva microbiología enológica
John Fain	Health Sciences Center. Univ. Memphis	Hormonal regulation of leptin release by human adipose tissue
Enrique Méndez	Unidad de Análisis Estructural de Proteínas. Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)	Análisis de péptidos y proteínas por Espectrofotometría de masas MALDI- TOF: la técnica del siglo 21
Michel D. Norenberg	Department of Pathology. Univ. Of Miami School of Medicine	Mitochondrial dysfunction and the permeability transition in Hepatic Encephalopathy and Ammonia Neurotoxicity
Ignacio Palmero	Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)	Papel de las proteínas ARF e ING en respuestas antioncogénicas
José López Barneo	Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario Virgen del Rocío	Mecanismos celulares de la sensibilidad del oxígeno
Jose M ^a Sánchez-Puelles	Pharma Mar, S.A.	Nuevas drogas antitumorales de origen marino
M ^a Angeles Balboa	IBGM-UVA. Valladolid	Enzimas que valen mil millones de dólares: fosfolipasas y ciclooxigenasas
Narahari V. Joshi	Institut de Ciencia dels Material. Univ. Valencia	Técnicas novedosas aplicadas a biotecnología

Cursos 2000 / 2001

a) Programa de doctorado del Departamento de Bioquímica

Curso 1999-2000

Bases bioquímicas y moleculares de la función celular I	Juan J. Aragón Reyes Antonio Coloma Jerez
Bases bioquímicas y moleculares de la función celular II	Claudio Fernandez. Heredia Roberto Marco Cuéllar
Bases bioquímicas y moleculares de la función celular III	Amparo Cano García Juan E. Felíu Albiñana
Seminarios de bioquímica y biología molecular	Pilar Santisteban Sanz Roberto Marco Cuéllar
Curso de operadores de instalaciones radiactivas	Leandro Sastre Garzón
Aplicación del HPLC a la Biomedicina	Pilar Llorente Rodríguez
RMN en Medicina y Biología	Sebastián Cerdán García-Esteller
Iniciación a la investigación en Regulación de la Expresión Génica	Rafael Garesse Alarcón Francisco Portillo Pérez Ana Aranda Iriarte
Iniciación a la investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer	Miguel Quintanilla Avila Angel Pestaña Vargas Amparo Cano García
Iniciación a la investigación en Bioquímica Metabólica y Patología Molecular	Jesús Cruces Pinto Juan José Aragón Reyes M ^a Antonia Günther Nonell
Iniciación a la investigación en Mecanismos de transducción de señales	Jaime Renart Pita José González Castaño Isabel Varela Nieto

Curso 2000-2001

Análisis de nuevos genes humanos y sus implicaciones patológicas	Antonio Coloma Jesús Cruces Belén Peral
Regulación de la transcripción en eucariotas	Ana Aranda Leandro Sastre Mario Vallejo
Resonancia Magnética en Biología y Medicina	Sebastián Cerdán Paloma Ballesteros (UNED)
Seminarios de Bioquímica y Biología Molecular	Pilar Santisteban Roberto Marco

Transducción de señales	Rosario Perona Margarita Fernández
Genética Molecular de las enfermedades de herencia mitocondrial	Rafael Garesse Joaquín Arenas (H. Doce de Octubre)
Cáncer, oncogenes y genes supresores	Alberto Muñoz Javier León (U. Cantabria)
Iniciación a la investigación en Regulación de la Expresión Génica	Rafael Garesse Alarcón Ana Aranda Iriarte Leandro Sastre Garzón
Iniciación a la investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer	Miguel Quintanilla Avila Angel Pestaña Vargas Amparo Cano García
Iniciación a la investigación en Bioquímica Metabólica y Patología Molecular	Jesús Cruces Pinto Juan José Aragón Reyes M ^a Antonia Günther Nonell
Iniciación a la investigación en Mecanismos de transducción de señales	Jaime Renart Pita José González Castaño Isabel Varela Nieto

b) Otros

Curso de Operadores de Instalaciones Radiactivas (2000)	María Teresa Macías
Técnicas de investigación básica y aplicada en el área de las Ciencias Biomédicas (2000). Proyecto Foccitcam	María Teresa Macías Gemma Rodríguez-Tarduchy
Técnicas de investigación básica y aplicada en el área de las Ciencias Biomédicas (2001). Proyecto Foccitcam	María Teresa Macías Gemma Rodríguez-Tarduchy
Secuenciación automática de ADN (2001) (Gabinete de formación del CSIC)	Gemma Rodríguez-Tarduchy

Producción científica

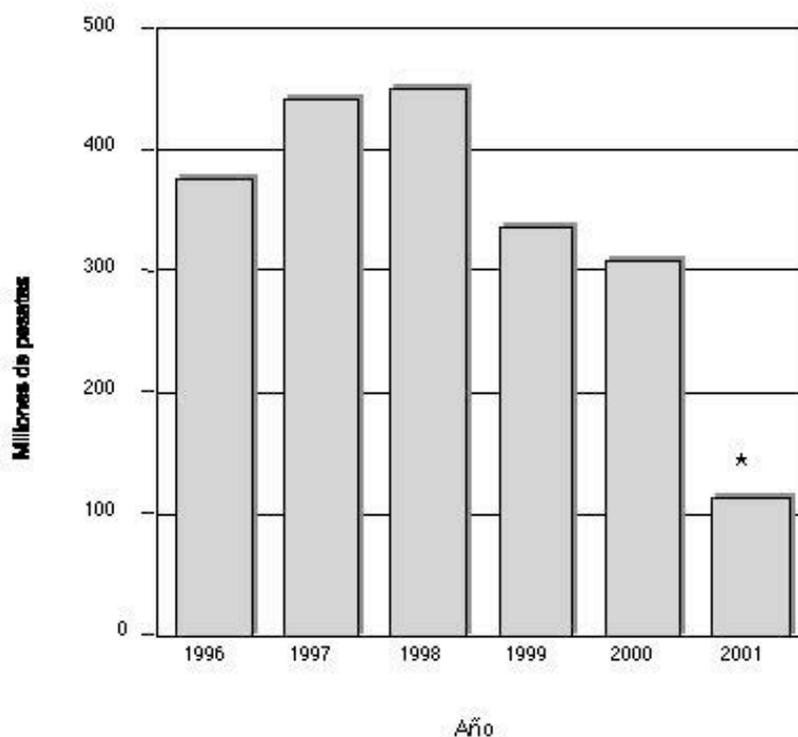
Producción científica del Instituto de Investigaciones Biomédicas

	Media de las tres últimas memorias	Memoria 2000-2001
n° de publicaciones	167	182
Impacto medio por revista	4,31	4,85
Media de publicaciones por investigador	3,5	3,57

Número de artículos publicados en las revistas más frecuentemente utilizadas

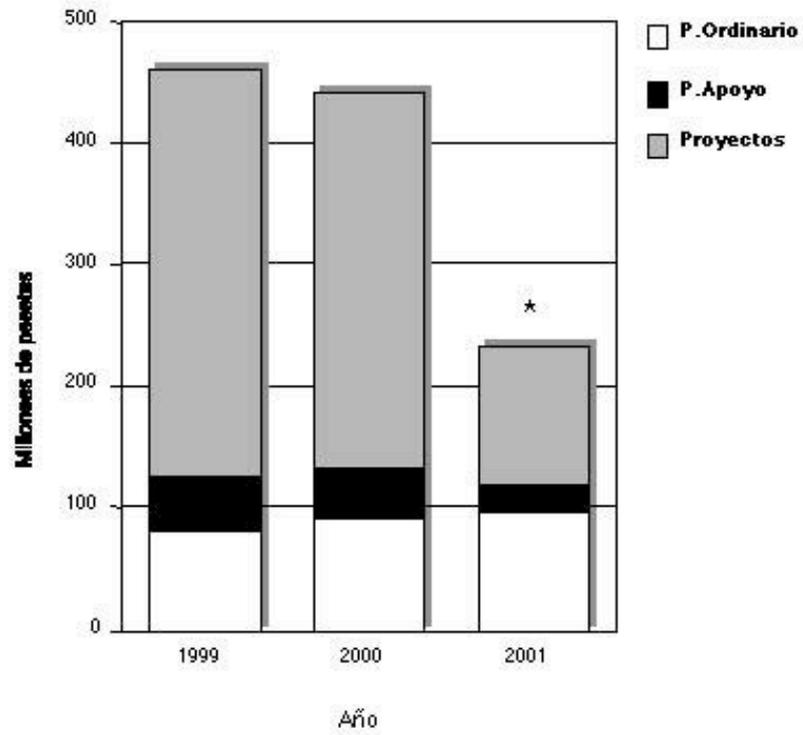
Media de las tres últimas memorias	Memoria 2000-2001
Endocrinology (11,3)	J. Biol. Chem (20)
J. Biol. Chem. (11)	J. Neurochem. (8)
FEBS Lett (9)	Oncogene (8)
Oncogene (7,7)	Endocrinology (6)
Biochim Biophys Acta (6,3)	Eur. J. Biochem. (6)
Yeast (4)	Biochem. J. (5)
J. Bacteriology (3,7)	Biochem. Biophys Res. Comm (4)
Eur. J. Biochem. (3,3)	Biochim Biophys Acta (4)
J. Cell Biochem (3,3)	FEBS Lett (4)
J. Neurochem. (3,3)	J. Bacteriology (4)

Evolución de los ingresos por proyectos de investigación



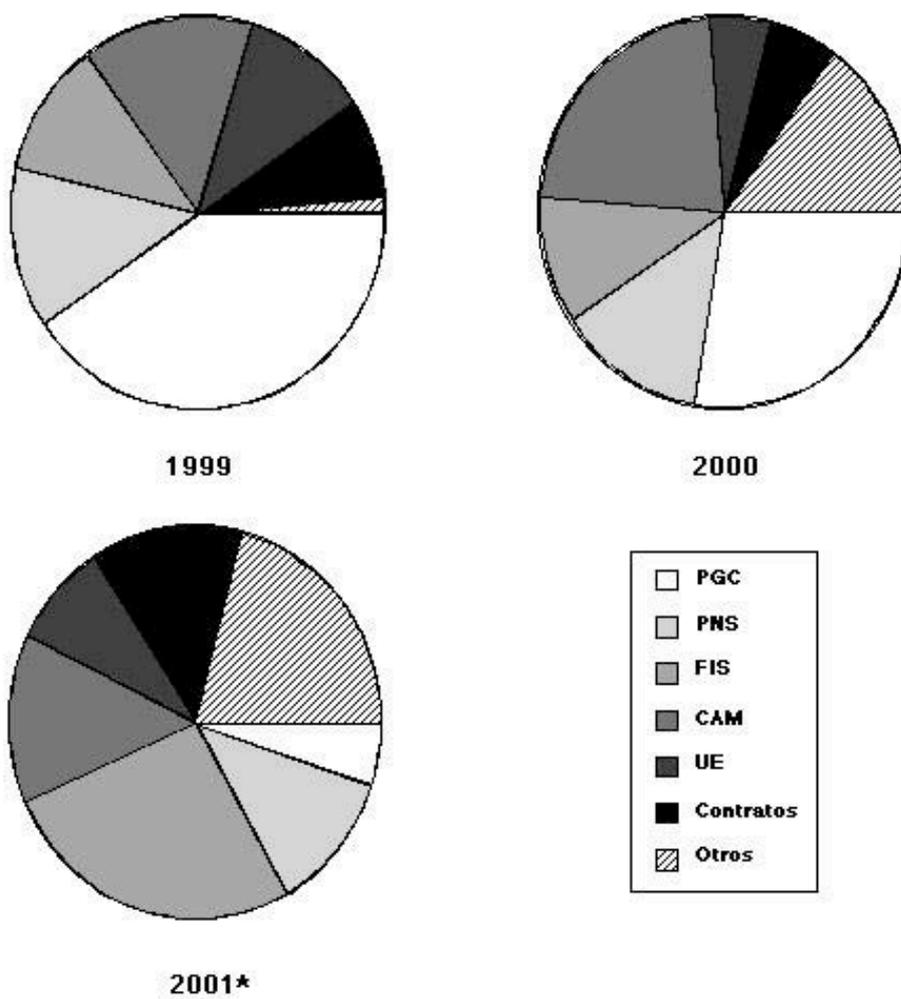
*Los datos del año 2001 están afectados por los retrasos ocurridos en el ingreso del dinero de los proyectos.

Ingresos de los últimos tres años



*Los datos del año 2001 están afectados por los retrasos ocurridos en el ingreso del dinero de los proyectos.

Distribución de los ingresos por entidades financiadoras



*Los datos del año 2001 están afectados por los retrasos ocurridos en el ingreso del dinero de los proyectos.

Indice de palabras clave

- 6-bisfosfatasa, 61
 Acoplamiento Neurona-Glía, 138
 Adipocitos, 96
 agentes antitumorales, cerebro, 88
 Agentes de Contraste, 138
 Akt, 208
 Akt/PKB, 196
 AMPc, 111
 análisis genómico, 57
 Antitumorales, 21
 APC, 14
 apoptosis, 217
 Apoptosis, 185, 208
 apoptosis, prostate cancer, 28
 arrays de ADN, 32
 Artemia franciscana, 190
 aspartato kinasa, 115
 astrocitos, 111
 beta-ATP sintasa, 168
 betaína, 150
 Cadherina-E, 14
 Calmodulina, 36
 cAMP, 61
 cancer, 185
 Cáncer, 138
 cáncer de pulmón, 164
 cáncer, angiogénesis, 88
 Candida, 47
 Carbohidratos, 120, 199
 carcinoma, 203
 celulas de Purkinje, 65
 cerebelo, 65
 cerebro, 80
 ciclo celular, 133
 cisplatino, resistencia, JNK, 28
 Citoquinas, 147
 colon, mama, oncogén erbA, 88
 Compartimentacion metabólica, 138
 comportamiento, 65
 control de la expresión génica, 171
 Cot/tpl-2 quinasa, 131
 Cromatina, 103
 Cultivos celulares, 179
 desarrollo, 65, 190
 Desarrollo, 176
 desarrollo cerebral, 213
 desiodasas, 96
 Diabetes, 199
 Diagnóstico y Pronóstico, 138
 Dictyostelium discoideum, 115, 190
 diferenciación, 185, 190, 213
 Diferenciación, 208
 diferenciación celular, 147
 diferenciación megacariocítica, 133
 Diferenciación neural, 111
 diferenciación y transformación celular,
 154
 Diferenciación, 103
 dinucleósido polifosfatos, 121, 126
 distribución intracelular, 53
 Drosophila, 160, 164
 Drosophila melanogaster, 171
 Drosophila,, 176
 E1A y terapia génica, 14
 E47, 14
 Efrinas, 75
 EGFR, 36
 embarazo, 80
 Endocitosis, 50
 Endoglin, 203
 Enfermedad, 179
 enfermedades neurodegenerativa, 171
 enfermedades neurodegenerativas, 196
 Envejecimiento, 176
 ERKs, 71
 esclerosis lateral amiotrófica, 164
 Espacio, 176
 especificidad de sustrato, 44
 Estrés del RE, 208
 estrés oxidativo, 196
 estriado, 65
 estructura y función, 150
 estructura-función, 44, 53
 Estudio genético, 182
 Excitotoxicidad, 208
 expresión génica, 131
 Expresión génica, 103, 182
 expresion génica múltiple, 32
 Factores de transcripción, 21
 Factores de transcripción específicos de
 tejido, 103
 feto, 80
 fosfo(Tyr)calmodulina, 36
 fosfofructokinasa, 115
 fosforilación, 53
 fructosa-1, 61
 GABP/NRF-2, 168
 Galactosemia, 199
 Gel bidimensional, 182
 Gen candidato, 182
 gen trkB, 213
 Genes musculares, 160
 genes tempranos, 185
 Genética Molecular Humana, 164
 glicolisis, 115
 Glucogenosis, 199
 Gravedad alterada, 176
 Grb7, 36
 griego(b)-catenina, 14
 GTPasas Ras y Rho, 21
 Guía axonal, 75
 hipotiroidismo, 88
 homeodominios, 111
 homocisteína, 150

- hormona tiroidea, 65, 88, 168
- Hsup(+)-ATPase, 57
- IGF-1, 217
- inactivación de transportadores, 50
- inmunofluorescencia, 168
- insulina, 111
- Insulina, 199
- interacción entre dominios, 44
- Intolerancia a la fructosa, 199
- intolerancia a la lactosa, 115
- Invasión tumoral, 14
- Jak2, 147
- Kidins220, 75
- knock-out, 164
- lactasa intestinal, 115
- leptina, 96
- levadura, 44, 47, 61
- levaduras, 115
- linfocitos, 131
- MAP kinasas, 71
- MAP kinasas, 208
- Map quinasa quinasa quinasa, 131
- MAPK, 203
- Metabolismo, 199
- Metabolismo del agua, 138
- metiltransferasa, 150
- metionina adenosyltransferasa, 150
- Metodología Espacial, 176
- Microarray de DNA, 182
- microglía, 213
- microtúbulos, 115
- mitocondria, 168, 171
- morfogénesis, 61
- Músculo,, 176
- mutagénesis, 53
- neonato, 80
- Neuroblastoma, 179
- neurodegeneración, 217
- Neurodegeneración, 75
- neurogénesis, 217
- Neurogénesis, 75
- neuronal, 185
- Neurotrofinas, 75
- NGF, 217
- NOIPP-58, 36
- nucleótidos purínicos, 121, 126
- obesidad, 96
- Oído interno, 217
- oligodendrocito, 213
- óxido nítrico, 36
- p38, 71
- p38MAPK, 36
- PA2.26, 203
- Patología humana, 182
- patología mitocondrial, 171
- patologías neuromusculares hereditarias, 164
- PI3K, 14
- Plasticidad sináptica, 75
- poli(A) polimerasa, 121, 126
- precursor APP, 179
- prematuros, 80
- progresión maligna, 203
- prolactina, 147
- proliferación, 147, 154
- Proliferación, 103
- Promotor, 190
- Proteína b-amiloide, 179
- Proteína quinasa C, 75
- Proteína quinasa D, 75
- proteínas quinasas, 57
- protein-O-manosil transferasas, 164
- proto-oncogen, 131
- PrP, 150
- PSA, NFkB, DNA repair, 28
- ras, 203
- Ras, 71
- Ras, 65
- Ras-GRF, 71
- ratones knockout, 168
- recambio de proteínas de membrana, 50
- Receptor de membrana, 179
- Receptor nuclear, 179
- receptores de hormona tiroidea, 168
- Receptores del glutamato, 208
- receptores nucleares, 65, 185, 213
- Receptores nucleares, 88, 154
- regulación génica, 88
- regulación metabólica, 115
- regulación por glucosa, 57
- regulación transcripcional, 53
- relaciones estructura/función, 115
- remodelación cromatina, 53
- replicación del DNA, 133
- replicación del mtDNA, 171
- represión catabólica, 61
- Represión transcripcional, 14
- Represores transcripcionales, 103
- Resonancia Magnética (RM), 138
- retinoblastoma, 32
- Rhes, 65
- Saccharomyces, 120
- SAGE, 32
- señalización feromonas, 53
- SFK, 147
- Sinaptogénesis, 75
- Síndrome de Williams, 164
- Smad4, 203
- Snail, 14
- SNP, 182
- Src, 36
- SRF, 190
- T3, 65, 96
- T4, 65, 96
- T4 RNA ligasa, 121, 126
- termogenesis, 96
- TGF-b1, 203
- tiroxina, 80
- transcripción, 154
- Transcripción, 179

- Transcripción, 103, 160
- Transcripción, 190
- Transducción de señales, 71
- Transducción de señales, 75
- Transducción de señales, 103
- Transgénesis, 160
- transportador ABC, 44
- Transporte, 75
- transporte intestinal de glucosa/galactosa, 115
- transporte intracelular, 57
- transporte vesicular, 53
- trehalosa, 47
- Triac, 96
- triyodotironina, 80
- Troponinas,, 176
- tubulina, 115, 168
- Tumores de Ewing, 32
- UCPs, 96
- Uniones estrechas, 14
- vacuola, 53
- Vías de señalización, 179
- xilosa, 61
- Yarrowia, 47
- yodo, 80