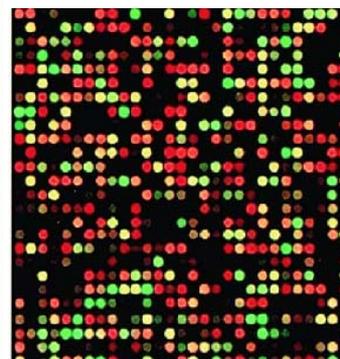
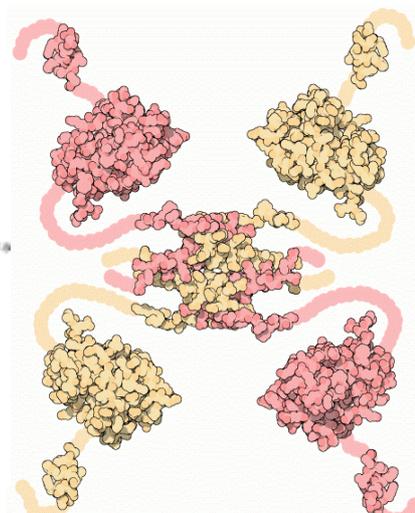
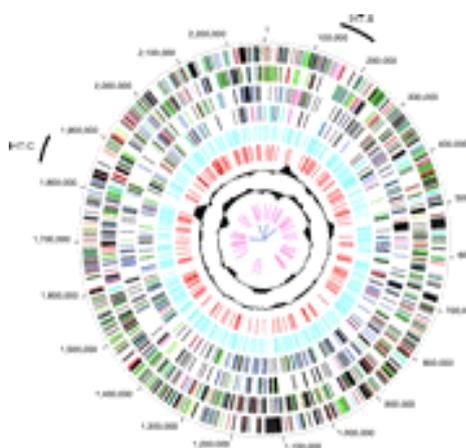


RED VALENCIANA DE



GENÓMICA Y PROTEÓMICA

**QUINTA REUNIÓN DE LA RED VALENCIANA DE
GENÓMICA Y PROTEÓMICA**

Salón de Actos del Centro de Investigación Príncipe Felipe.
9 de Noviembre de 2006



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

9.15 h. Presentación de la Reunión.

José E. Pérez. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València.

9:30 h. Presentaciones científicas invitadas. Iniciativas actuales en Genómica y Proteómica.

Moderadores: *Juanjo Calvete*. IBV (CSIC) y *Susana Rodríguez-Navarro* (CIPF).

9:30 h. *Angel García*. Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford; y RIAIDT, Universidad de Santiago de Compostela.

Proteómica aplicada al análisis de vías de señalización intracelular en plaquetas humanas.

10:15 h. *J. Enrique O'Connor*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València y Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Citómica: Estrategias para el análisis funcional en poblaciones celulares complejas

11:00. Descanso y visita pósters. Coffee-break ofrecido por Beckman-Coulter.

11:30. David Blesa. Centro de Investigación Príncipe Felipe y Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

Posibilidades del Análisis Genómico Funcional. El Servicio de Análisis de Microarrays de ADN del CIPF

12:15. Anna González. Centro Nacional de Genotipado. CNIO.

Análisis masivo de SNPs para la búsqueda de genes involucrados en cáncer.

13:00. Descanso para comida y visita pósters. Tickets para comer en el autoservicio del CIPF, para los ponentes, ofrecidos por Durviz SLU.

Comunicaciones libres

14:30. Sesión I: Genómica Funcional. Moderador : *Manuel Talón (IVIA)*

- R. Ferrer-Luna. Departamento de Química-Física. Universitat de València

Pérdida de Heterozigosidad, Perfiles de Expresión y Metabolómica en Gliomas

- Maria Luisa Mansego. Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario València.

Influencia del sistema Ras en el desarrollo de hipertensión en mujeres.

- Manuel Mata. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, UCIM.

Modulación de los perfiles de expresión génica por inhibidores PDE4 en células epiteliales de vías aéreas expuestas a estrés

- Belén López-Gracia. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

Utilización de herramientas genómicas en el estudio del modo de acción del péptido antimicrobiano PAF26 sobre Saccharomyces cerevisiae.

- I. Moreno. Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia

Análisis del perfil transcripcional del mutante cwt1 de Candida albicans en distintas fases del ciclo poblacional.

- Francisco Tadeo. Centro de Genómica - Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Expresión génica diferencial asociada a la abscisión en cítricos.

- Leandro Hueso. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV).

Análisis transcriptómico del desarrollo partenocárpico inducido del fruto del tomate.

- María José Asins. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. I.V.I.A
Construcción y comparación de dos mapas genéticos de ligamiento de las especies Citrus clementina y C. grandis.

16:30. Sesión II: Servicios y Redes de Genómica o Proteómica. Moderador: Oscar Coltell (UJI)

- Carlos Saavedra. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. C.S.I.C.
La Red de Excelencia Marine Genomics Europe y la investigación en genómica de las almejas y otros moluscos bivalvos.
- Guillermo Martín. Beckman Coulter. Biomedical Research Division
GenomeLab GeXP, una nueva herramienta para el estudio cuantitativo de expresión génica mediante ensayo multiplex.
- Manuel M. Sánchez del Pino. Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe
Caracterización estructural de proteínas de interés biomédico mediante técnicas de proteómica.

17:15. Descanso y visita pósters. Coffee-break ofrecido por Hucoa-Erlöss

17:50. Sesión III: Proteómica. Moderador: Ismael Mingarro (UVEG).

- Antonio Marcilla. Departamento de Biología Celular y Parasitología. Universitat de València.
Análisis mediante técnicas de proteómica de las interacciones parásito-hospedador en el modelo Echinostoma-roedor.
- Libia Sanz. Instituto de Biomedicina de Valencia. C.S.I.C.
Proteómica versus transcriptómica del veneno de Bitis gabonica gabonica.
- Roque Bru. Dto. Agroquímica y Bioquímica, Fac. Ciencias. Universidad de Alicante.
Análisis proteómico diferencial de raíz de plantas de tomate (Lycopersicon esculentum M. cv Jaguar) bajo condiciones de deficiencia de hierro.
- Marc A. Marti-Renom. Department of Bioinformatics CIPF.
Modelling the structures of proteins and macromolecular assemblies

18:50: Sesión IV: Genómica Comparada y Bioinformática. Moderador: Joaquín Dopazo (CIPF)

- Jaime Huerta-Cepas. Bioinformatics Department. Centro de Investigación Príncipe Felipe
The Human Phylome.
- Antonio Fabregat. Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos. Universitat Jaume I.
Herramientas para la obtención, compactación y alineamiento de secuencias de ADN basadas en los principios de matrices dispersas: proyectos AliMatrix y DispMatrix
- Javier Forment. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV- C.S.I.C.).
EST2uni: una herramienta bioinformática para el análisis automatizado y la creación de bases de datos de ESTs accesibles vía web.

19:35: Fin de la jornada.

Patrocinadores:



Conferencias Invitadas

PROTEÓMICA APLICADA AL ANÁLISIS DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN PLAQUETAS HUMANAS

Ángel García Alonso

Oxford Glycobiology Institute, Department of Biochemistry, University of Oxford; RIAIDT, Vicerrectorado de Investigación, Universidad de Santiago de Compostela.

e-mail: agarcia@usc.es

Durante los últimos años la proteómica se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de vías de señalización intracelular en plaquetas humanas. Las plaquetas son unas células pequeñas, sin núcleo, que se forman a partir de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos, células localizadas en la médula ósea. Las plaquetas circulan en la sangre con la función principal de contribuir a la cicatrización de heridas mediante la formación de trombos. Desde un punto de vista patológico las plaquetas están involucradas en las enfermedades trombóticas y cardiovasculares, hoy consideradas como la primera causa de muerte en el mundo occidental. Dado que las plaquetas no tienen núcleo, el análisis por proteómica es la mejor forma de estudiarlas desde un punto de vista bioquímico.

La activación plaquetaria se basa en varias vías de señalización intracelular que pueden ser activadas por diferentes agonistas. Dicha activación constituye a menudo el primer paso previo a la agregación plaquetaria y la formación de un trombo. Algunas de las principales vías de transducción de señal que se pueden activar en plaquetas son las de receptores como GPVI (glicoproteína VI), activado por colágeno, o PAR-1 (*protease-activated-receptor-1*), activado por trombina. En los últimos años nuestro grupo ha sido pionero en aplicar la proteómica a la investigación sobre plaquetas, y más concretamente al análisis de las vías de señalización antes mencionadas [García *et al.* (2004) *Proteomics* 4:656-668; García *et al.* (2004) *Blood* 103:2088-2095; García *et al.* (2005) *Mass Spectrom. Rev.* 24:918-930; García *et al.* (2006) *Proteomics, in press*]. Dichos análisis se basaron en separar las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y 1D-SDS-PAGE, seguida de tinción con *dyes* fluorescentes de gran sensibilidad, tanto para detectar proteína total como para detectar sólo aquellas proteínas que estuvieran fosforiladas. Tras la tinción, se procedió al correspondiente análisis de imagen diferencial. Finalmente, las proteínas de interés se digirieron con tripsina y se identificaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Además, se identificaron lugares de fosforilación y se utilizaron anticuerpos específicos para analizar más en detalle, mediante inmunoprecipitaciones y *western blot*, aquellas proteínas de interés que pudieran jugar un papel relevante en las cascadas de señalización estudiadas. De esta manera se identificaron numerosas proteínas nunca descritas con anterioridad en plaquetas que podrían estar jugando un papel fundamental en la activación plaquetaria por trombina y colágeno. En el primer caso destaca la proteína adaptadora Dok-2 y en el segundo G6f, una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas cuyo ligando se desconoce, y que se fosforila específicamente en el residuo tirosina Y281 tras activar las plaquetas con colágeno, permitiendo así su unión a la proteína adaptadora Grb2. Estas y otras proteínas, identificadas gracias al abordaje experimental basado en la proteómica, están siendo ahora estudiadas más en detalle con la esperanza de descubrir nuevas dianas farmacológicas que permitan un mejor tratamiento de las enfermedades trombóticas.

CITÓMICA: ESTRATEGIAS PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL EN POBLACIONES CELULARES COMPLEJAS

Guadalupe Herrera, Alicia Martínez-Romero, Robert C. Callaghan, Laura Díaz, Eva Villamón, Sandra Ballester, Angela Gomes, José-Enrique O'Connor

Laboratorio de Citómica, Unidad Mixta CIPF-UVEG. Centro de Investigación Príncipe Felipe, Avda. Autopista del Saler, 16. 46013-Valencia.

Por analogía con los conceptos y términos acuñados para las disciplinas "ómicas" (genoma-genómica, proteoma-proteómica, metaboloma-metabolómica), el término "Citómica" se debe relacionar con el concepto "Citoma". Los **citomas** pueden ser definidos como los sistemas y subsistemas celulares y los componentes funcionales del organismo. El citoma representa el conjunto de los procesos celulares complejos y dinámicos en los que se basa la fisiología celular. La heterogeneidad de los citomas, resultante de la expresión del genoma y de la exposición de las células a factores externos, es abordada por la **citómica**, disciplina definida como el estudio de los fenotipos moleculares de las células individuales en combinación con la extracción bioinformática del conocimiento así obtenido.

La citómica tiene como objetivo el conocimiento del diseño molecular y la funcionalidad de los citomas mediante el análisis célula a célula, una aproximación que permite evitar la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías en las que se obtienen valores promedios a partir del análisis simultáneo de números elevados de células o de homogeneizados de tejidos. En su contexto aplicativo, la citómica pone en relación la tecnología citométrica (sistemas multiparamétricos de detección y medición) con la biología (estructura y función) e integra la citometría de flujo y la citometría estática en el conjunto de las ciencias "-ómicas", como se ejemplifica aquí con datos de nuestra propia investigación.

La citometría de flujo (CMF) permite la medida simultánea de fluorescencias múltiples y de dispersión de luz inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección. La CMF es una poderosa metodología que permite cuantificar simultáneamente múltiples parámetros biológicos en la misma célula o partícula, a una velocidad que alcanza miles de eventos por segundo. Por ello, se ha convertido en una herramienta de elección en estudios básicos, clínicos y aplicados en biología celular y molecular, biotecnología, la toxicología, la microbiología, fisiología vegetal y ciencias acuáticas. Los separadores celulares ("Cell sorters") permiten aislar células individuales según sus propiedades citométricas. Con ellos se puede purificar simultáneamente varias subpoblaciones celulares o, por el contrario, depositar una sola célula en un pocillo de una placa u otro soporte adecuado. La separación de subpoblaciones celulares, especialmente las escasas y de gran relevancia (células madre, transfectantes o productoras) es un proceso clave en la interacción de la CMF con otras técnicas citómicas basadas en la imagen, o con las -ómicas moleculares.

La posibilidad de observar mediante análisis microscópico la distribución de múltiples marcadores fluorescentes en células individuales ha llevado al emergente campo del análisis de imagen de alto contenido ("HCS-bioimaging"). El desarrollo de sistemas informáticos que permiten extraer de forma automatizada la vasta información contenida en las imágenes, ha producido instrumentos que combinan alta resolución temporal y espacial con elevada velocidad de análisis. La detección de células individuales suministra información sobre las respuestas de poblaciones heterogéneas y la posibilidad de mantener condiciones ambientales controladas permite el estudio sobre células vivas. Estos sistemas tienen gran aplicación en el estudio de fármacos y en ensayos de toxicidad. Las perturbaciones producidas por estos compuestos a nivel de subpoblaciones celulares pueden detectarse eficazmente, analizando multiparametricamente eventos como ciclo celular, apoptosis, viabilidad, motilidad, morfología o translocación molecular en células individuales.

Posibilidades del Análisis Genómico Funcional. El Servicio de Análisis de Microarrays de ADN del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

David Blesa

Responsable del Servicio de Análisis de Microarrays

CIPF

La tecnología de microarrays de DNA es una técnica fundamental en el análisis genómico y permite la caracterización molecular de expresión de RNA, modificaciones del genoma, modificaciones epigenéticas o uniones proteína/DNA (ChIP on chip). Esto permite tanto la caracterización de una muestra como el establecer correlaciones entre características genómicas y variables fenotípicas de un conjunto de muestras. El nuevo Servicio de Análisis de Microarrays del CIPF ofrece recursos humanos y técnicos para este tipo de análisis. El Servicio dispone de una estación de hibridación TECAN HS 4800 Pro y un escáner Agilent G2565BA situados en una sala con filtrado de ozono ambiental. Con este equipamiento podemos procesar cualquier microarray impreso sobre portas estándar (25mm x 75mm) y comerciales como los de Agilent Technologies, GE Healthcare (Codelink), Combimatrix, Spectral Genomics, Clontech, etc., que brindan gran variedad de organismos representados y tipos de arrays. El análisis genómico por medio de microarrays ofrece muchas posibilidades que no están al alcance de todo el mundo por falta de equipamiento o de conocimiento especializado. El Servicio de Análisis de Microarrays quiere paliar esta carencia y, en conjunción con el Departamento de Bioinformática del CIPF, ofrece un proceso integral de asesoramiento en el diseño experimental, análisis físico de las muestras, almacenamiento y manejo de datos en formato MIAME y análisis experto de los datos. El usuario, en función de sus necesidades, podrá solicitar todo o cualquier parte del servicio como asesoramiento, análisis físico de las muestras o, por supuesto, análisis de datos que ya posea.

Como ejemplo de la capacidad del análisis genómico se mostrarán los resultados obtenidos en un proyecto de investigación para el estudio de gliomas humanos desarrollado en colaboración con el Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Los distintos tipos de cánceres presentan características y comportamientos específicos, que hace que sean en realidad enfermedades muy diferentes. Los tumores del cerebro (glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, meningiomas, meduloblastomas, ependimomas) constituyen una de las principales causas de muerte por cáncer. Existe en ocasiones una gran dificultad en la clasificación de los tumores mixtos, no existiendo un consenso para la clasificación de estos tumores como oligodendrogliomas puros u oligoastrocitomas. Una de las alteraciones genéticas descritas en los oligodendrogliomas anaplásicos es la pérdida de heterocigosidad (LOH) en los brazos corto del cromosoma 1 (1p) y largo del cromosoma 19 (19q). Una definición molecular de los distintos grupos podría constituir uno de los primeros pasos en el entendimiento de la biología de estos tumores y contribuir al diagnóstico y tratamiento de estos pacientes. En el CNIO, desarrollamos arrays genómicos y específicos del cromosoma 19 para el análisis del perfil genómico de estos tumores con el objeto de avanzar en su conocimiento. Se mostrarán los resultados obtenidos en este sentido.

Large Scale analysis of SNPs to identify susceptibility genes in cancer.

Anna González-Neira.

Genotyping Unit. Human Cancer Genetics Programme. Spanish National Cancer Research Centre (CNIO). Madrid. Spain.

The genetic diversity among individuals is a field of intense investigation, mainly because it explains the basis of inherited variation in disease susceptibility. About 90% of human variation has been ascribed to single nucleotide polymorphisms. SNPs are single base pair positions in genomic DNA at which different sequence (single nucleotide) alternatives (alleles) exist in normal individuals in some populations. A SNP located in a coding region of the genome (cSNPs) is referred to as a non-synonymous variant if it generates a change of the corresponding amino acid, and as synonymous variant otherwise. SNPs may also be located in regulatory regions that govern gene expression (rSNPs), but are most commonly found in intronic regions.

Over the last two decades, research on inherited cancer susceptibility has focused on the identification of high penetrance genes segregating with disease in large family pedigrees and linkage analysis has led to the identification of genes involved in several common cancers. On the other hand, association studies are particularly efficient for the identification of genes with relatively common variants that confer a modest or small effect on cancer risk.

In the last few years, SNPs have received much attention in both linkage and association studies because these biallelic markers exhibit a widespread distribution across the genome, and even more importantly, they are easy to work with in genotyping, having greater potential for automation. A new generation of high throughput genotyping technologies is allowing us to undertake more ambitious large scale projects in order to identify these cancer susceptibility genes.

Genómica Funcional

Pérdida de Heterozigosidad, Perfiles de Expresión y Metabolómica en Gliomas. e-TUMOUR (FP6-LSH503094).

R. Ferrer-Luna¹, MC. Martínez-Bisbal¹, D. Monleón², V. Esteve¹, M. Mata³, F.V. Pallardó³, H. Martinetto⁴, B. Celda^{1,2}.

1.-Unidad de Aplicaciones Biofísicas y Biomédicas de RMN. Dpto. Química-Física, Universitat de Valencia. UVEG.

2.-Laboratorio de Imagen Molecular, SCSIE. Facultad de Medicina, Universitat de Valencia. UVEG.

3.-Unidad Central de Investigación Médica, UCIM. Facultad de Medicina, Universitat de Valencia. UVEG.

4.-Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Neuropatología. FLENI, Buenos Aires.

Introducción.

Los tumores cerebrales son diversos tanto en su aparición clínica como en conducta biológica, diferenciación histológica, y respuesta a terapias. Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más comunes y a pesar de los avances en diagnóstico por imagen, neurocirugía y tratamientos quimio y radioterapéuticos siguen siendo devastadores.

Mejorar el conocimiento en la biología de los tumores cerebrales puede incrementar la precisión en el diagnóstico y pronóstico y contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

En esta comunicación analizamos las amplificaciones y pérdidas de heterozigosidad de 16 gliomas de alto grado con 110.000 SNPs que proporcionaron una cobertura del 92% del genoma, el perfil de expresión de 125 tumores cerebrales con 38.500 genes o 47.000 transcritos, y 129 resonancias correspondientes a 37 metabolitos distintos en 34 tumores cerebrales por HR-MAS.

El objetivo de esta comunicación es mostrar la complementariedad entre datos genómicos y metabolómicos en el diagnóstico y clínica de los tumores cerebrales empleando protocolos multicéntricos desarrollados en el proyecto Europeo eTUMOUR (FP6-LSH503094).

Métodos.

Los tipos de tumores cerebrales analizados fueron Glioblastomas, Astrocitomas, Oligodendrogliomas, Oligoastrocitomas, Meduloblastomas, Ependimomas, Meningiomas y Metástasis, la mayoría de ellos contaron con estudios de ERMI *in vivo* previo al estudio.

Adquisición de datos metabólicos.

El estudio completo de HR-MAS fue realizado a 4°C y con velocidad de giro a 4KHz en un equipo *Bruker* 500MHz o 11.7T. Fueron adquiridas secuencias de una dimensión 1D 1H *CPMG* y *water presaturation*.

Adquisición de datos genómicos.

El RNA fue extraído a partir de 125 biopsias empleando métodos estándar. La calidad de la muestra se garantizó por análisis espectroscópicos de los ratios A260/A280 (entre 1.9-2.1) y por el ratio 28S/18S (superior a 1.1) determinado con bioanalizador Agilent2100. El análisis de expresión se realizó con el array HG-U133Plus2.0.

El DNA fue aislado a partir de 10 mg de tejido tumoral de 16 pacientes con gliomas de alto grado con métodos convencionales. El *call rate* medio de los arrays indicador de la calidad de la extracción de DNA, amplificación y proceso de hibridación fue del 95.5%. El análisis se realizó con el array HuSNP 100k.

Resultados.

El análisis con datos genómicos y metabolómicos de tumores cerebrales en este estudio permitió la clasificación molecular entre los diferentes tipos de tumores. Adicionalmente distintos perfiles metabólicos fueron identificados entre gliomas de alto grado, la principal diferencia fue relacionada con el contenido necrótico, ambos grupos mostraron expresión génica diferencial. De los 350 genes que presentaron mas diferencias entre grupos metabólicos fueron destacables las diferencias encontradas en genes implicados en ciclo celular, coagulación y respuesta inflamatoria. Las regiones más comunes de LOH fueron 22q13.1-13.33, 10q21.2-25.2, y 9p13.3-23 algunas de ellas informadas en estudios precedentes.

Estos resultados sugieren la viabilidad de una caracterización bioquímica extensiva de las biopsias de tumores cerebrales con datos genómicos y metabólicos.

INFLUENCIA DEL SISTEMA RAS EN EL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN EN MUJERES

M.L. MANSEGO TALAVERA¹, V. GONZALÉZ ALBERT¹, A.B. GARCÍA GARCÍA¹, S. BLESA LUJÁN¹, J. REDON MAS², F.J. CHAVES MARTÍNEZ¹

¹Lab. Estudios Genéticos, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario València, València, España ²Servicio de Medicina Interna, Hospital Clínico Universitario de València. Universitat de València. València. España

Con la edad y la aparición de la menopausia se incrementan los valores de presión arterial sistólica (PAS) y en consecuencia el riesgo de Hipertensión Arterial esencial (HTAe). Se han propuesto varios sistemas implicados tales como el cambio en el cociente estrógeno/andrógeno, modificaciones en el endotelio, el aumento de estrés oxidativo y la activación del sistema Renina-Angiotensina(RAS) entre otros; aunque los mecanismos responsables todavía no se conocen completamente. Por ello, nos planteamos analizar la influencia de los polimorfismos presentes en el sistema RAS en relación con los valores de PAS y en el riesgo de desarrollar HTAe en un grupo de mujeres entre 40 y 65 años mediante sistemas de alto rendimiento para el genotipado. Se estudiaron todos los genes que forman el sistema RAS : *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *ACE*, *AGTRAP* y *RENBP*. Sujetos y Métodos: Se analizaron 566 mujeres entre 45 y 60 años (edad media: 54±5 años; Índice de Masa Corporal (IMC) : 27±5 Kg/m²; PAS/PAD: 125±18/77±11 mmHg y 27 % de hipertensas). Se realizaron medidas de parámetros antropométricos y clínico-bioquímicos. Los polimorfismos a estudiar se localizaron a lo largo de cada gen de interés (promotor, exones y regiones intrónicas próximas a los exones) y se seleccionaron en función a su posible impacto, frecuencia y posición, analizándose entre 8 y 17 por gen y un total de 70 SNPs. Los SNPs fueron analizados por SNPlex (sistema de genotipado que utiliza la tecnología de OLA/PCR que permite el análisis de 48 polimorfismos simultáneamente). Resultados: Para cada gen, se observó una asociación entre determinados polimorfismos, valores de PAS y con el riesgo de HTAe ajustados por edad e IMC, excepto en los genes *AGTR2*, *AGTRAP* y *RENBP*. El análisis de haplotipos mostró que el gen de la renina tenía una mayor asociación con el riesgo de desarrollar HTAe. Conclusión: En nuestra población de mujeres hemos encontrado evidencias de asociación entre diferentes polimorfismos del sistema RAS y los niveles de PAS, y a su vez con un mayor riesgo de HTAe. Siendo de gran ayuda en este estudio la utilización de plataformas de genotipado a media-gran escala para evaluar la compleja influencia de los polimorfismos genéticos en la regulación de la presión sanguínea, en el desarrollo de la Hipertensión.

MODULACION DE LOS PERFILES DE EXPRESION GENICA POR INHIBIDORES PDE4 EN CELULAS EPITELIALES DE VIAS AEREAS EXPUESTAS A ESTRÉS OXIDATIVO

Mata M.¹, Cortijo J.² y Morcillo EJ.².

(1)Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, UCIM.

(2)Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, Dpto. de Farmacología.

El estrés oxidativo es un elemento clave en la respuesta inflamatoria que se produce a nivel bronquial en patologías como el asma o la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. El AMP cíclico es un segundo mensajero que determina muchos de los aspectos de la función celular a través de la activación de la PKA. Este nucleótido cíclico es inactivado por las PDE. Aunque se han descrito múltiples isoformas de las PDE la PDE4 constituye la mayor isoenzima implicada en la regulación del AMPc en células inflamatorias y estructurales de las vías aéreas. Estudios realizados tanto in vivo como in Vitro demuestran la eficacia de los inhibidores selectivos PDE4 como supresores de la actividad de muchos de estos procesos inflamatorios. En este trabajo hemos analizado los cambios en la expresión génica inducidos por el peróxido de hidrógeno en un cultivo de células epiteliales humanas a las cuatro y 24 horas. Para ello hemos utilizado microarrays de Affymetrix (U133A). Así mismo hemos analizado los efectos de un inhibidor de PDE4 selectivo, el piclomilast, sobre dichos perfiles, encontrando una modulación significativa en numerosos genes relacionados con apoptosis, ciclo celular, inflamación, etc. Por otra parte hemos analizado por RT-PCR y wetstern-blott alguno de dichos genes, confirmando los resultados obtenidos con affymetrix.

Utilización de herramientas genómicas en el estudio del modo de acción del péptido antimicrobiano PAF26 sobre *Saccharomyces cerevisiae*

López-García, B., Muñoz, A. y Marcos, J.F.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA)-CSIC. Apartado de Correos 73. Burjassot. 46100 Valencia. Correo electrónico: lopezb@iata.csic.es

El hexapéptido antimicrobiano PAF26 fue identificado previamente por nuestro grupo mediante la utilización de estrategias combinatoriales y de diseño racional. PAF26 tiene propiedades antimicrobianas diferenciadas y específicas de hongos fitopatógenos. Como objetivo general de este trabajo proponemos la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo unicelular para el estudio del modo de acción de pequeños péptidos antifúngicos, y en particular de PAF26, desde una perspectiva de genómica funcional.

Se ha caracterizado la sensibilidad de diferentes cepas de *S. cerevisiae* a PAF26 y al péptido hemolítico Melitina como un control de péptido antimicrobiano citolítico de modo de acción conocido. Se han analizado los cambios en el transcriptoma de *S. cerevisiae* por la exposición a concentraciones subinhibitorias de PAF26 y Melitina. La hibridación de macromatrices y el análisis de sus resultados nos ha permitido identificar genes con expresión diferencial en cada una de las condiciones de estudio con respecto al control en ausencia de péptido. Por ejemplo, por la exposición a PAF26 cambian su expresión el 7% de 5.470 genes analizados. Además se han observado cambios diferenciados en el transcriptoma de *S. cerevisiae* por el tratamiento con PAF26 o Melitina, probablemente como consecuencia de un distinto modo de acción sobre la levadura. El análisis de anotación funcional por ontología génica revela entre los genes inducidos una representación significativa de genes implicados en respuesta a estrés o a estímulos (algunos de ellos reguladores), componentes estructurales de pared celular, y transportadores de carbohidratos. Cabe destacar la inducción por tratamiento con PAF26 de la expresión de determinados genes que codifican para glicoproteínas de pared celular. Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real se han comprobado sus cambios de expresión. Estos resultados indican que la levadura responde de forma activa a la acción del péptido PAF26 con alteraciones específicas de la estructura y/o composición de su pared celular. Se ha analizado la sensibilidad a ambos péptidos antimicrobianos de cepas de *S. cerevisiae* deletantes en los genes seleccionados, sobre distintos fondos genéticos, demostrando la implicación de diferentes genes.

El uso de la levadura como modelo es de interés en el estudio de los posibles determinantes de la actividad y/o especificidad en distintos péptidos antimicrobianos, y esperamos que conduzca a la identificación de posibles genes candidatos en hongos filamentosos. Los resultados obtenidos serán de utilidad en el diseño de péptidos antimicrobianos con actividad mejorada.

ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE *cwt1* DE *Candida albicans* EN DISTINTAS FASES DEL CICLO POBLACIONAL

Moreno, I., Castillo, L., Sentandreu, R., Valentín, E.

Laboratorio GMCA. Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n. 46100- Burjassot. Valencia.

CaCwt1 es un factor de transcripción putativo de *C. albicans* homólogo a Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*. La falta de esta proteína en *S. cerevisiae* produce un efecto pleiotrópico destacando la resistencia a drogas y defectos en la formación de la pared celular. Estos cambios son también detectables en *C. albicans*. La expresión de *CaCWT1* es diferencial a lo largo del ciclo de crecimiento de la levadura, y es mayoritariamente expresado en la fase estacionaria tardía de crecimiento. (Moreno *et al.*, 2003; Akache *et al.*, 2001; Akache *et al.* 2002).

Con el objetivo de clarificar la función de *CaCWT1* se realizaron análisis de micromatrices de DNA de la cepa mutante respecto de la parental tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. En la cepa mutante se encontraron un total de 460 genes con expresión alterada en fase exponencial y 666 genes en fase estacionaria. En ambas fases de crecimiento el 8% de los genes desregulados estaban relacionados con la arquitectura de la pared celular. La expresión de otros factores de transcripción se vio modificada en el mutante nulo *cwt1* (nueve en la fase exponencial y diecisiete en la fase estacionaria), pero sólo unos de ellos presentaba un nivel de expresión diferencial en ambas fases de crecimiento. Este hecho podría indicar que el pleiotropismo presentado por el mutante nulo *cwt1* no es debido únicamente a la ausencia de éste, sino también a los cambios de expresión de otros factores transcripcionales. Además, un grupo importante de genes involucrados en la traducción de proteínas y en la biosíntesis de ribosomas presentaron niveles de expresión alterados en la cepa mutante.

Haciendo uso del programa informático T-profiler (Boorsma *et al.*, 2005) se identificaron grupos de genes que comparten motivos comunes en sus regiones 5' no-codificantes y también se clasificaron los genes de acuerdo a diferentes categorías ontológicas. Entre los grupos identificados se encontraron genes relacionados con la arquitectura de la pared celular y con la síntesis de proteínas.

El software RSAT se utilizó para predecir sitios teóricos de unión a DNA para este factor de transcripción. La búsqueda se realizó en secuencias de 800 pb de la región 5' no-codificante de aquellos genes con expresión alterada al menos 1,5 veces de las diferentes categorías funcionales. El algoritmo usado por este programa identifica motivos reguladores que aparecen en los genes elegidos con una frecuencia superior a la que se presenta de manera aleatoria en el genoma. Entre los genes de pared celular que presentaron expresión diferencial en el mutante nulo se identificaron ocho motivos teóricos de unión a DNA, mientras que en el grupo de traducción de proteínas se encontraron sólo dos posibles secuencias que podrían ser responsables de la unión de este factor de transcripción a DNA.

REFERENCES:

- Akache *et al.* (2002). New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem.* 277; 24: 21254-60.
- Akache *et al.* (2001). Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins. *Nucleic Acids Res.* 29; 10: 2181-90.
- Boorsma *et al.* (2005). T-Profiler: scoring the activity of predefined groups of genes using gene expression data. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33, W592-5.
- Moreno *et al.* (2003). Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity. *FEMS Microbiol Lett.* 12; 226(1):159-67.

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ASOCIADA A LA ABCISIÓN EN CÍTRICOS: COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS DE ZONA DE ABCISIÓN LAMINAR OBTENIDAS MEDIANTE DISECCIÓN MANUAL Y MICRODISECCIÓN ASISTIDA POR LASER

Javier Agustí, Paz Merelo, Manuel Cercós, Francisco R. Tadeo*, Manuel Talón

Centro de Genómica - Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

Carretera Moncada-Náquera km 4,5. 46113 Moncada (Valencia)

**ftadeo@ivia.es*

La abscisión es un proceso fisiológico programado genéticamente y controlado tanto a nivel hormonal como medioambiental que culmina con el desprendimiento de diferentes órganos de la planta al activarse un tejido especializado, la zona de abscisión (ZA). Las fitohormonas etileno (ET) y auxinas están consideradas como factores reguladores positivos y negativos, respectivamente, de la abscisión. Las etapas finales de la abscisión están asociadas a la actividad de varias enzimas hidrolíticas que actúan disolviendo tanto la lámina media como la pared primaria de las células de la ZA. De manera concomitante a este proceso degradativo se produce la diferenciación de un tejido protector en la zona de separación correspondiente a la planta encargado de sellar la herida provocada por la abscisión. Por tanto, las etapas tardías de la abscisión están caracterizadas por cambios en la pared celular que implican la actividad de enzimas relacionadas con la remodelación y la degradación de polisacáridos estructurales.

Con el fin de analizar el perfil transcripcional en la zona de abscisión laminar (ZAL) activada de cítricos, incubamos durante 24 h explantes de hojas a las que habíamos eliminado parcialmente el limbo foliar en un ambiente con ET y separamos, mediante disección manual (DM) y microdisección asistida por laser (MAL), dos tipos de muestras correspondientes a ZAL y peciolo de la hoja. La DM nos permitió obtener una muestra que contenía todos los tipos celulares presentes en el peciolo y otra muestra de peciolo que estaba enriquecida en ZAs. La MAL nos permitió obtener muestras homogéneas compuestas por células de la ZAL y células corticales de peciolo. Con el RNA extraído, amplificado y marcado con Cy5 y Cy3 (dye swap) hibridamos micromatrices de cDNA que contenían 12672 clones de cítricos que representaban 6875 posibles unigenes.

Mediante un método rápido y sencillo de MAL, pudimos obtener RNA de excelentes características a partir de células de la ZAL y del córtex del peciolo de la hoja de los cítricos. La doble amplificación del RNA así obtenido rindió suficiente aRNA para realizar el análisis de expresión génica diferencial. La muestra obtenida por MAL es más completa que la obtenida por DM, puesto que amplía el número de miembros de las familias génicas asociadas a la remodelación y degradación de la pared celular y, además, añade otros nuevos elementos al escenario de la abscisión. La utilización de la MAL nos ayudará a obtener una visión panorámica y detallada de los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de abscisión de estructuras vegetativas y reproductivas en los cítricos.

Análisis transcriptómico del desarrollo partenocárpico inducido del fruto del tomate.

Leandro Hueso, Cristina Martí, Miguel Angel Perez-Amador, Antonio Granell,
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Valencia.

El mecanismo mediante el cual diferentes hormonas vegetales inducen la formación de un fruto en ausencia de polinización ha sido estudiado. Tratamientos exógenos con giberelinas y auxinas así como la modificación de la respuesta a giberelinas en plantas de tomate transgénicas fueron capaces de desarrollar frutos sin semillas aunque con diferencias a nivel morfológico. El tratamiento hormonal también mimetiza el proceso de endoreduplicación del DNA que normalmente acompaña el proceso de expansión en el fruto, pero frecuentemente da lugar a frutos con una morfología alterada y elevados TSS.

La micromatriz TOM1 se ha utilizado para investigar el programa de expresión genica que conduce a la inducción de un fruto. Mientras que muchos de los cambios en el transcriptoma resultaban ser similares entre los frutos (activación del metabolismo anabolico, ciclo celular, remodelación de la pared celular etc.) había diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. De esta forma se encontraron diferentes sets de genes inducidos de una manera específica de hormona a lo largo del tiempo y otros que diferían en cuanto a expresión los inducidos por hormonas de los del fruto polinizado.

Algunos genes candidatos específicos de hormona y de estado de desarrollo han sido seleccionados y su expresión confirmada por RT PCR cuantitativa. Regiones genómicas “rio arriba” de estos genes han sido clonados mediante “genome walking” y se pretende su utilización para ingeniería genética del fruto y su desarrollo. Esto ayudará por una parte a desentrañar los procesos que permiten la formación del fruto y pueden eventualmente tener implicaciones biotecnológicas.

Construcción y comparación de dos mapas genéticos de ligamiento de las especies *Citrus clementina* y *C. grandis*.

Fernández-Ribacoba J, Bernet GP, Asins MJ

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. I.V.I.A. Apdo. oficial; 46113 Moncada (Valencia)

Actualmente, los cítricos son uno de los cultivos frutales más importantes, con un área cultivada de 7.5 millones de Ha y una producción mundial de más de 105 millones de toneladas (FAO, 2005), lo que ha promovido la investigación dirigida al desarrollo de nuevas variedades.

Disponer de mapas genéticos para las diferentes especies de cítricos posibilita la genómica comparativa y facilita el uso eficiente de sus recursos fitogenéticos en los programas de mejora. Los mapas de ligamiento son una herramienta fundamental en la localización de genes y QTLs (“Quantitative Trait Loci”) implicados en el control genético de caracteres de interés agronómico, la mayoría de naturaleza cuantitativa (producción, calidad, tolerancia a enfermedades, adaptación a condiciones adversas...).

A pesar de la compleja biología reproductiva de los cítricos, se han publicado ya un total de 25 mapas genéticos de cítricos correspondientes a especies de interés para la citricultura, ya sea por su utilización como patrón (*C. aurantium*, *C. volkameriana*, *Poncirus trifoliata*...), o por la producción de fruta para consumo en fresco o zumo (*C. sinensis*). En el caso de algunas especies de gran importancia económica como *C. clementina*, todavía no se ha estudiado comparativamente su mapa genético, lo cual constituye el primer objetivo de este trabajo.

Se analizaron dos familias de 174 híbridos en total, obtenidas por cruzamiento controlado en las dos direcciones posibles, entre un híbrido de *C. clementina* (la variedad “Fortune”) y un híbrido de *C. grandis* (la variedad “Chandler”, resistente al virus de la tristeza de los cítricos). Para el análisis de marcadores moleculares se utilizaron un total de 80 pares de cebadores diseñados para amplificar distintos tipos de marcadores moleculares incluyendo análogos de resistencia, SSRs, SCARs, e IRAPs. Estos últimos fueron los que permitieron detectar más loci polimórficos.

El 59.46% de los marcadores analizados para el mapa de *C. clementina* presentaron distorsión de segregación, mientras que este porcentaje resultó ser de 38.98% en el de *C. grandis*. Tanto en *C. clementina* como en *C. grandis*, los grupos de ligamiento que muestran distorsión de segregación varían en función de quién actúe como parental masculino o femenino. En ambas familias, es el parental masculino el que presenta mayor proporción de marcadores con distorsión de segregación.

Comparando los 2 mapas se observa una buena correspondencia entre marcadores comunes, si bien existen marcadores ligados en un genotipo que se localizan en dos grupos distintos en el otro, sugiriendo la presencia de diferencias cromosómicas estructurales. Por otra parte, al comparar estos mapas con los propuestos para otras especies del género *Citrus*, se observan algunas variaciones en la ordenación de los marcadores entre grupos de ligamiento homeólogos. Uno de los grupos más afectados es el 4 donde se localiza la resistencia de *Poncirus trifoliata* a CTV, de ahí su interés en el estudio genético de la resistencia de “Chandler”.

Servicios y Redes de Genómica o Proteómica.

La Red de Excelencia Marine Genomics Europe y la investigación en genómica de las almejas y otros moluscos bivalvos.

Carlos Saavedra, David Cordero y Juan B. Peña

Grupo de Biología y Cultivo de Moluscos, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ribera de Cabanes, 12595 Castellón

E-mail:

En marzo de 2004 comenzó su andadura Red de Excelencia “Marine Genomics Europe” (MGE), bajo el paraguas financiero del VI programa marco de la UE. El objetivo de esta red, que agrupa a más de 450 investigadores de 44 instituciones de 14 países europeos (más Israel y Chile), es la implementación de enfoques genómicos de alto rendimiento en los principales centros de investigación en Biología Marina de Europa. La actividad científica de la red se basa en gran medida en la existencia de un grupo de instituciones de probada experiencia en estudios genómicos, que actúan como plataformas a las que los grupos participantes pueden acudir conjuntamente para el desarrollo de herramientas de uso compartido (genotecas, microarrays, proyectos de secuenciación) o análisis de datos (bioinformática, microarrays, QTL). Otro de los aspectos fundamentales de MGE es la difusión de la genómica en el ámbito de otras instituciones no participantes en la red, de empresas, y del público general, lo que se consigue a través de la organización de congresos, talleres, demostraciones en centros de transferencia tecnológica y relaciones con los medios de comunicación.

Las actividades de MGE se desglosan en 4 nodos de enfoques transversales: Microorganismos, Algas, Evolución y Desarrollo, y Peces y Moluscos. Este último nodo está orientado fundamentalmente al estudio genómico de problemas de interés en especies comerciales, fundamentalmente en peces y moluscos que son objeto de acuicultura. En MGE hemos desarrollado 36 genotecas de cDNA de las principales especies de bivalvos cultivadas en Europa y hemos obtenido más de 30000 EST de 6 especies. El IATS es uno de los 3 centros del CSIC participantes en MGE, a través del grupo de investigación sobre Moluscos. Nuestro equipo lidera un proyecto de colaboración con otros equipos de España (IRTA-CA), Portugal (CCMAR) e Italia (UniPadova), para el estudio del genoma de las almejas. Este grupo de organismos constituye el segundo grupo de bivalvos de importancia comercial del mundo, después de la ostra. A partir de 4 genotecas de cDNA se han obtenido unos 7000 ESTs. Se están desarrollando marcadores genéticos, que nos permitirán la elaboración de mapas de ligamiento, y está prevista la construcción de un microarray. Con estas herramientas se abordará la detección de genes implicados en caracteres de interés productivo. Nuestro objetivo final es convertir esta ingente cantidad de información sobre el genoma de las almejas en conocimiento útil para la ciencia y para el sector del cultivo de moluscos.

GenomeLab GeXP, una nueva herramienta para el estudio cuantitativo de expresión génica mediante ensayo multiplex

Guillermo Martín Ortega

Beckman Coulter. Biomedical Research Division

El análisis cuantitativo de la expresión génica está jugando un rol cada vez más importante en la investigación biomédica. Las técnicas actuales utilizan el análisis mediante microarray para la detección de un gran número de genes por reacción, o por otro lado, la utilización de PCR a tiempo real para la detección de un pequeño número de genes. Para los investigadores es de gran interés un acercamiento a este tipo de estudios mediante un ensayo multiplex, en el que se puedan analizar de forma rápida un panel de genes relacionados con cualquier tipo de fenómeno o enfermedad utilizando una cantidad limitada de RNA. El sistema de análisis genético GenomeLab GeXP ha sido desarrollado para responder a esa demanda. Este sistema utiliza la tecnología eXpress Profiling, un sistema mediante PCR en multiplex que permite el análisis de entre 20 y 30 genes por muestra. Con una alta robustez de análisis y un coste por reacción muy bajo el GenomeLab GeXP es capaz de dar hasta 6000 resultados de expresión génica por día.

Caracterización estructural de proteínas de interés biomédico mediante técnicas de proteómica.

Valero, L.¹, Aguado Velasco, C.¹, Dionís, E.¹, Sirvent, E., Mora, P. y Sánchez del Pino, M.M.^{1,2}

1) Laboratorio de Proteómica y 2) Laboratorio de Péptidos y Proteínas, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.

La información estructural de las proteínas es de vital importancia para el conocimiento íntimo de los mecanismos moleculares de los procesos en los que participan. Asimismo, el conocimiento estructural de las proteínas es clave para el diseño y desarrollo de fármacos y otros compuestos moduladores de interés. La difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear son las técnicas que proporcionan el mayor detalle estructural de las proteínas. Sin embargo, problemas de solubilidad, estabilidad o tamaño hacen que un gran número de proteínas no sean accesibles a estas técnicas. En nuestro laboratorio estamos trabajando con distintas proteínas de interés biomédico implicadas en procesos celulares clave. Hasta el momento, la información estructural de las mismas es escasa o inexistente. El empleo de proteólisis limitada, agentes entrecruzantes y la modificación específica de residuos, combinadas con la espectrometría de masas nos están proporcionando una valiosa información estructural que nos permite profundizar en el conocimiento y caracterización de estas proteínas.

Proteómica

ANALISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE PROTEOMICA DE LAS INTERACCIONES PARASITO-HOSPEDADOR EN EL MODELO *ECHINOSTOMA*-ROEDOR

Antonio Marcilla^{1*}, Dolores Bernal², Javier Sotillo¹, Ana Pérez-García¹, Melissa Higón¹, Carla Muñoz-Antolí¹, José Guillermo Esteban¹, Rafael Toledo¹

¹ Área de Parasitología, Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. V.A. Estellés, s/n, 46100Burjassot, Valencia (email:Antonio.Marcilla@uv.es)

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Dr. Moliner, 50, 46100Burjassot, Valencia

El sistema *Echinostoma*-roedor es un buen modelo de laboratorio para estudiar las parasitosis intestinales por helmintos, ya que el parásito se puede mantener fácilmente en distintos hospedadores definitivos y sus estadios larvarios se desarrollan sin dificultades en diversas especies de caracoles de laboratorio. Asimismo, en función de la especie de hospedador definitivo experimental utilizada se ha observado que se producen diferentes tipos de infección. Así, en hospedadores de alta compatibilidad con el parásito como hámsters y ratones, los parásitos producen infecciones crónicas perdurando hasta más de 25 semanas postinfección según las especies. En el caso de rata, hospedador de baja compatibilidad, los parásitos se desarrollan mucho peor y son expulsados entre 4-5 semanas postinfección.

Con el fin de caracterizar las proteínas de los parásitos implicadas en la interacción con los hospedadores se ha realizado un estudio comparativo de identificación de dichas moléculas presentes tanto en extractos totales de parásitos como en el material que excretan/secretan al exterior (E/S) mediante técnicas de proteómica (electroforesis bidimensional y espectrometría de masas) e inmunodetección con anticuerpos heterólogos. La identificación de dichas proteínas en unos organismos de los que no se dispone de su genoma, y donde el número de proteínas en las bases de datos es muy reducido, hace necesario combinar dichas tecnologías.

Los resultados obtenidos han permitido poner de manifiesto la presencia de proteínas potencialmente antigénicas en dichos extractos y evidenciar el distinto perfil de presencia de algunas proteínas en hospedadores de alta y baja compatibilidad, lo cual puede resultar de gran interés para explicar el diferente curso de la infección en cada hospedador. Dichos resultados serán discutidos en la presentación.

Estudios financiados por los siguientes proyectos de investigación: CGL2005-02321/BOS del Ministerio de Educación y Ciencia; GV04B-107 y GV05/039 de la Conselleria D'Empresa, Universitat i Ciència, Generalitat Valenciana; y Accions Especials 20050201 de la Universitat de València.

Proteómica versus transcriptómica del veneno de *Bitis gabonica gabonica*.

Calvete, J.J.¹, Marcinkiewicz, C.², Sanz, L.^{1,*}

¹ Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain.

*Libia.Sanz@ibv.csic.es

² Biotechnology Center, Temple University College of Science and Technology, 1900 N. 12th Street, Philadelphia, PA 19122-6078, USA

Los venenos de serpientes de la familia *Viperidae* son mezclas complejas de toxinas que, sin embargo, pertenecen a solo unas pocas familias de proteínas: enzimas (serinproteasas, Zn²⁺-metalloproteasas, L-aminoácido oxidasas, fosfolipasas A2) y proteínas sin actividad enzimática (disintegrinas, C-lectinas, péptidos natriuréticos, miotoxinas, CRISP, factores de crecimiento vascular y nervioso, inhibidores de proteasas). La caracterización del contenido proteico de los venenos, además de proporcionar pistas sobre la evolución de las toxinas y la ecología de las serpientes, es potencialmente relevante para el desarrollo de herramientas moleculares de utilidad en investigación básica y clínica, así como para el diseño racional de antisueros específicos. El abordaje más utilizado en los últimos años para el estudio de los venenos es la caracterización del transcriptoma de las glándulas de Dubernoy. Estos estudios proporcionan catálogos de mRNAs sintetizados por las glándulas del veneno pero no proporcionan información directa sobre el proteoma secretado en el veneno. Nosotros hemos iniciado la caracterización proteómica de diversos venenos mediante separación de proteínas por RP-HPLC, secuenciación de Edman, MALDI-TOF MS y SDS-PAGE de cada fracción, y CID-MS/MS de iones seleccionados de digeridos de bandas electroforéticas. Esta estrategia nos permite determinar la abundancia relativa y la diversidad estructural de las familias de toxinas presentes en los venenos. La comparación de los datos proteómicos y del transcriptoma del veneno de *Bitis gabonica gabonica* muestra diferencias significativas entre las actividades transcripcional y transduccional de la glándula del veneno. Además, las técnicas proteómicas nos proporcionan información sobre la estructura cuaternaria de toxinas, no deducible del catálogo de mRNAs.

Análisis proteómico diferencial de raíz de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M. cv Jaguar) bajo condiciones de deficiencia de hierro

Disante, K.¹; Oliver, M.²; Juarez, M.J.²; Casado-Vela, J.³; Casal, I.³; Sellés, S.¹; Bru, R.¹

¹Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas, Dto. Agroquímica y Bioquímica, Fac. Ciencias, Unv. Alicante, Ap 99, 03080 Alicante

²Grupo de Química Agrícola, Dto. Agroquímica y Bioquímica, Fac. Ciencias, Unv. Alicante, Ap 99, 03080 Alicante

³CNIO, Laboratorio de Tecnología de Proteínas, Biotecnología, C/ Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 MADRID

e-mail: Roque.Bru@ua.es

La deficiencia de hierro es uno de los principales desordenes nutricionales a los que los cultivos de la península Ibérica se ven sometidos, provocando importantes pérdidas en frutales, vid o tomate. Se calcula que el consumo anual en fertilizantes para evitar los daños producidos por esta deficiencia asciende a más de 36 millones de euros. Los mecanismos moleculares implicados en la percepción, captación y traslocación del hierro en las plantas están todavía lejos de conocerse a un nivel similar al de organismos modelo como procariontes y levaduras (Curie & Briat, 2003). En la era postgenómica todos los actores de la investigación biológica coinciden en que la forma más directa e intensiva de obtener información molecular relevante en relación con problemas biológicos es el análisis de los organismos mediante técnicas genómicas y proteómicas (Cash, 2002). El éxito en la consecución de información útil de un organismo está en relación directa con la extensión y anotación de las bases de datos de secuencias de dicho organismo. Las bases de datos de tomate y otras solanáceas, son de las mejor dotadas en cuanto a número de secuencias y anotaciones. En este marco de recursos genómicos, ha sido posible el abordaje a nivel proteómico de problemas fisiológicos de frutos de tomate relacionados con estrés abiótico, como la podredumbre apical (Casado-Vela y col. 2005), o estrés biótico, como la infección por TMV (Casado-Vela y col. 2006). En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio proteómico de las proteínas solubles de raíces de tomate crecidas en cultivo hidropónico en condiciones controladas. El proteoma en condiciones óptimas se ha comparado con el proteoma en condiciones de deficiencia de hierro y deficiencia en hierro mas una enmienda con sustancias húmicas. El análisis proteómico, basado en un flujo de trabajo de geles 2D, análisis densitométrico de imagen, digestión en gel e identificación basada en espectrometría LC-MS/MS, nos ha permitido identificar más de 200 proteínas implicadas en múltiples rutas metabólicas y procesos celulares y constatar la expresión diferencial de proteínas con función antioxidante, proteínas PR y proteínas del metabolismo de hidratos de carbono, en condiciones de deficit de hierro. La aplicación de una sustancia húmica caracterizada, que consigue paliar en un alto grado la clorosis inducida por déficit de hierro, restaura asimismo la mayoría de los niveles de proteínas alterados por la carencia nutricional.

Referencias

Casado-Vela, J.; Sellés, S.; Bru, R. (2005) *Proteomics* 5, 2488-2496

Casado-Vela, J.; Sellés, S.; Bru, R. (2006) *Proteomics* (en prensa)

Cash, P. (2002). *Biologist* 49, 58-62

Curie, C; Briat, J.F. (2003) *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 183-206

MODELING THE STRUCTURES OF PROTEINS AND MACROMOLECULAR ASSEMBLIES

Marc A. Marti-Renom

Structural Genomics Unit. Department of Bioinformatics

CIPF, Valencia

Structural genomics aims to determine or accurately predict 3D structure of most proteins. This aim is being achieved by a focused, large-scale determination of protein structures by X-ray crystallography and NMR spectroscopy, combined efficiently with accurate protein structure prediction. Comparative protein structure modeling will be discussed in this context. To allow large-scale modeling, we automated fold assignment, sequence-structure alignment, comparative model building, and model evaluation. These steps were implemented mostly in the MODELLER package. The modeling pipeline has been applied to all of the approximately 1.9 million protein sequences in the SWISS-PROT database, resulting in models for segments of approximately 1 million proteins. These models are stored in the MODBASE database, accessible over the web. In this context, several examples of how comparative modeling can be useful in the biological analysis of individual proteins as well as whole genomes will be described including an approach that combines comparative protein structure modeling of assembly subunits with their docking into low resolution electron density maps obtained by electron microscopy.

**Genómica
Bioinformática**

Comparada

y

The Human Phylome

Jaime Huerta-Cepas, Hernán Dopazo, Joaquín Dopazo and Toni Gabaldón

Bioinformatics Department. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Autopista del Saler, 16. 46013 Valencia (Spain).

In order to gain insight into the evolution and function of the human genome and the proteins encoded therein, we reconstruct here the complete collection of phylogenies of all human protein-coding genes. To do so we develop a fully automated pipeline to reconstruct the phylogenies of every protein encoded in the human genome and its homologs in other 38 eukaryotic species. Such pipeline aims at resembling, as much as possible, the manual procedure used by phylogeneticists while remaining a fully automated process. The pipeline includes evolutionary model testing, parameter estimation and alignment trimming as well as implements a Bayesian phylogenetic approach to provide posterior probabilities. As a result, building the human phylome presented here took two months on a total of 140 64-bits processors, which is roughly equivalent to 20 years in a single processor. To our knowledge this represents the most sophisticated phylome reconstruction pipeline and the largest computing-time investment for a single phylome reported to date.

The analysis of this so-called *human phylome*, that includes evolutionary relationships of human proteins among thirty-nine fully-sequenced eukaryotic genomes, allows us to test several evolutionary hypotheses, including the relative position of some eukaryotic lineages or the absence of recent horizontal gene transfers from other eukaryotes. Moreover, we assess the extent of gene duplication events occurred in the lineages leading to hominids and explore their relationship with the functional roles of the protein families involved. Finally, by using a novel algorithm that outperforms previous automatic methods, we derive the complete set of orthology and paralogy relationships of human genes among fully sequenced eukaryotic genomes.

Herramientas para la obtención, compactación y alineamiento de secuencias de ADN basadas en los principios de matrices dispersas: proyectos AliMatrix y DispMatrix

Oscar Coltell¹, Antonio Fabregat¹, Manuel Forner^{1,2}, María Arregui¹, Olga Portolés¹, Elisabet Barrera¹, Yasmina Andreu¹, Dolores Corella³

¹ Grupo de investigación BioinfoGenómica. Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos. Universitat Jaume I. Castellón. España.

² Departamento de Matemáticas. Universitat Jaume I. Castellón. España.

³ Departamento de Medicina Preventiva. Escuela de Medicina. Universitat de València. Valencia. España.

RESUMEN

El proyecto «Biotools» pretende construir una herramienta modular aplicada a la solución de problemas que los investigadores biomédicos suelen tener al manejar datos de ADN o ARN. Biotools se compone de varios subproyectos formando un módulo autónomo dentro de la herramienta final. Uno de ellos es AliMatrix-Biotool, herramienta desarrollada para obtener y mantener secuencias de ADN (y ARN) a partir de ficheros en formatos ABI de *Applied Biosystems* (1), FASTA o texto plano. Principalmente, AliMatrix-Biotool soporta el multialineamiento de secuencias basado en comparaciones contra una secuencia consenso. El algoritmo de alineamiento usado es el de *Smith & Waterman* con control de apertura, extensión de GAP y selección de matriz de ponderación en función de las necesidades del usuario. Los resultados se almacenan en una estructura compacta llamada “AMB” (formato *AliMatrix Biotool*), que optimiza el espacio de almacenamiento. AMB se compone de vectores que representan los alineamientos de la secuencia consenso con cada una de las muestras. Estos vectores se asocian a estructuras que aportan información extra sobre cada alineamiento. El conjunto de vectores final se estructura mediante una tabla hash en la que cada vector tiene asociado un identificador, de forma que se agiliza el almacenamiento y acceso de cada elemento. Esta estructura es serializable, facilitando su almacenamiento o transmisión por la red.

DispMatrix-Biotool, otro subproyecto, transforma la estructura AMB para representar los datos en una matriz dispersa de tipo DMB, estructura de datos que permite optimizar el análisis de las muestras alineadas. Se aplica la teoría matemática de matrices dispersas para optimizar el espacio de almacenamiento, considerando todas las bases de las secuencias de muestra en las que no se ha encontrado ningún cambio tras ser analizadas y comparadas con la consenso. Un problema del algoritmo de *Smith & Waterman*, es que permite la apertura y extensión de GAPS, con los que se cuenta al crear la estructura DMB y en el análisis a posteriori. Así pues, DMB también facilita la ejecución de algoritmos de análisis para encontrar patrones en la estructura que sean útiles al investigador. Biotools se realiza con Java, que permite el uso de componentes de las bibliotecas estándar y garantiza la portabilidad entre plataformas en las que se pueda instalar la JVM (*Java Virtual Machine*) de Sun Microsystems (2). También se pretende obtener un conjunto integrado e independiente (de plataformas e instrumentos propietarios) que, desde una sola interfaz se ejecuten las herramientas integradas. Esto marca la diferencia con otras propuestas, como Staden Package (3), Rockefeller toolset (4), o productos asociados a determinados instrumentos de análisis (5). Biotools está en permanente ampliación debido a su estructura modular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos P11A2005-07 (Universitat Jaume I), GV05/133 (Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia, Generalitat Valenciana) y 018/2006 (Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana). Otra contribución adicional ha venido desde la red temática “INBIOMED. Plataforma de almacenamiento, integración y análisis de datos clínicos, genéticos, epidemiológicos e imágenes orientada a la investigación sobre patologías” (G60/160. Instituto de Salud “Carlos III” - Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo); y el proyecto PI050904 (Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo).

REFERENCIAS

1. Applied Biosystems Home Page. <http://www.appliedbiosystems.com/>.
2. Java Runtime Environment Home Page. <http://java.com/es/download/index.jsp>.
3. The Staden Package WWW site. <http://staden.sourceforge.net/>.
4. The Rockefeller Univ. An Alphabetic List of Genetic Analysis Software. <http://linkage.rockefeller.edu/soft/>
5. Applied Biosystems. Sequence Scanner Software v1.0 home page. <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>.

EST2uni: una herramienta bioinformática para el análisis automatizado y la creación de bases de datos de ESTs accesibles via web.

Javier Forment ⁽¹⁾, Francisco Gilabert ⁽³⁾, Antonio Robles ⁽³⁾, Vicente Conejero ⁽¹⁾, Fernando Nuez ⁽²⁾ y Jose Blanca ⁽²⁾

(1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, IBMCP (Universidad Politécnica de Valencia - C.S.I.C.). Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia.

(2) Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (Universidad Politécnica de Valencia). Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia.

(3) Grupo de Arquitecturas Paralelas (Universidad Politécnica de Valencia). Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia.

EST2uni es una herramienta de análisis de ESTs capaz de convertir, de modo totalmente automatizado, un conjunto de cromatogramas, o de secuencias de nucleótidos, en una base de datos de ESTs altamente estructurada y con extensiva anotación que puede ser consultada mediante una interfaz web orientada al usuario. El análisis de las ESTs se realiza mediante programas estándar de pre-procesado, agrupamiento y anotación, y el software es altamente modular, facilitando así la incorporación de nuevos métodos y análisis. Las opciones del análisis son fácilmente adaptadas a las necesidades locales mediante la modificación de un único fichero de configuración, el cual es un simple fichero de texto que proporciona los parámetros utilizados por los distintos análisis. Una vez configurada, EST2uni funciona sin intervención del usuario, y la base de datos es poblada con los resultados de los análisis en tiempo real. Los análisis pueden ser realizados en un solo ordenador o en un conjunto de ellos en paralelo, beneficiándose así de las capacidades multiprocesador de dichos sistemas. El sitio web creado por EST2uni es una avanzada herramienta de minería de datos con una interfaz que, aunque fácil de usar, permite la realización de búsquedas complejas combinando diferentes criterios de búsqueda. El sitio web facilita también el uso de diferentes herramientas bioinformáticas estándar, como diseño de primers y búsquedas BLAST contra la base de datos, y el acceso puede ser protegido mediante contraseña. Esta herramienta ha sido desarrollada por el esfuerzo conjunto del Proyecto Español del Genoma de Melón (www.melogen.upv.es) y el Proyecto Español de Genómica Funcional de Cítricos (citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es). El software es libre y gratuito, se encuentra disponible para descarga desde la dirección web www.melogen.upv.es/genomica/web_estpipe, y su desarrollo es abierto y colaborativo. Cualquier investigador es libre de usarlo y/o desarrollarlo, así como de tener un sitio web generado por EST2uni con sus secuencias privadas. El sistema está siendo continuamente mejorado mediante la incorporación de nuevos métodos y análisis.

Posters

Robustness and fragility of a minimal metabolic network

Gabaldón, T(1), Peretó, J (2,3) Montero, F (4), Gil, R (2), Latorre, A (2) and Moya, A (2)

1. Bioinformatics Department. Centro de Investigacion Principe Felipe, Valencia. 2 Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Spain. 3 Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, 46071 València, Spain. 4 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense, Madrid.

Analysis of minimal genomes aim to define the repertoire of genes that is necessary and sufficient to support cellular life. A combined investigation of all previously used computational and experimental strategies for addressing that issue was performed. By integrating data from comparative genomics and large-scale deletion studies, and checking that all genes involved in essential pathways needed to maintain a coherent metabolic map, we previously proposed a minimal gene set comprising 208 protein-coding genes. To evaluate the consistency of the metabolism encoded by such minimal genome we have carried out a series of computational analyses. Firstly, the topology of the minimal metabolism was compared to that of the reconstructed networks from natural bacterial genomes. Secondly, the robustness of the metabolic network was evaluated by simulated mutagenesis and, finally, the stoichiometric consistency was assessed by automatically deriving the steady state solutions from the reaction set. The results indicated that the proposed minimal metabolism presents stoichiometric consistency, and that it is organized as a complex, power-law network with topological parameters falling within the expected range for a natural metabolism of its size. The robustness analyses revealed that most random mutations do not alter significantly the topology of the network but do cause significant damage, by preventing the synthesis of several compounds or compromising the stoichiometric consistency of the metabolism. The implications that these results have, on the origins of metabolic complexity and on the theoretical design of an artificial minimal cell, will be discussed.

Poster nº 1

Phylemon: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics and phylogenomics

Joaquín Tárraga, Leonardo Arbiza, Jaime Huerta-Cepas, Ignacio Medina, Toni Gabaldón, Joaquín Dopazo and Hernán Dopazo

Bioinformatics Department. Centro de Investigación Príncipe Felipe. c/ep Avda. Autopista del Saler 16. 46013. Valencia. Spain.

Phylemon is a web server that integrates a suite of more than 20 different phylogenetic analysis tools from various sources. It is conceived as a natural response to the increasing demand of data analysis of many experimental scientists willing to add a molecular evolution and phylogenetics insight into their research. In this context, Phylemon does not intend to be a collection of as-many-methods-as-possible, but a useful tool able to provide a simple, easy but rigorous solution to scientific questions that frequently arise in phylogenetics and evolutionary analyses.

Programs included in Phylemon range from multiple sequence alignments (ClustalW and Muscle), most basic algorithms of distance and parsimony methods (Phylip programs), to more complex maximum likelihood (TreePuzzle, PhyML) and Bayesian methods (MrBayes) for phylogenetic reconstruction.

Moreover, Phylemon provides evolutionary tests for the search of the best evolutionary model explaining DNA (ModelTest) and protein (Protest) sequences under the HYPHY environment; relative rate tests (RRTree); tests of positive selection by means of branch, sites and branch-sites models of PAML (codeml); and site-wise likelihood ratio test (SLR) for detection of sites under positive and negative selection.

One of the most relevant qualities of Phylemon is that all applications can be easily inter-connected in a user-friendly pipeline. The user is guided through a complex phylogenetic analysis by means of suggested programs and tests and internally inter-converting all necessary formats. As an example, this feature allows a Phylemon user to get, using a multiple sequence file as an input, a highly-reliable phylogenetic tree and the total number of sites under positive and negative selection in about 10 mouse clicks without installing any application, and with a single click to repeat the analysis on similar data. In this way, users can not only have access to very well equipped and easy to use workbench for running phylogenetic analyses, but may build and save their own pipelines for running complex analyses in a traceable manner that is easier than running even some of the simplest programs individually.

Phylemon users can log in anonymously or using a self password-account. They can create projects and a complete register of the input and output files are saved in order to follow the analysis once the project is loaded in a new session.

Finally, when hundreds of alignments are necessary for a typical phylogenomic analysis, a full automatic phylogenomic analysis can be executed in Phylemon using default pipelines or defining custom pipelines by means of a Java applet.



project load | new | my projects log in | log out | register

Phylemon
a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics and phylogenomics

PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Home | **Tools** | News | About Bioinformatics Department

User logged in as hjd, working on one project

Phylemon web server is available at <http://phylemon.bioinfo.cipf.es>

Poster nº 2

Mecanismos evolutivos de diversificación estructural de las disintegrinas bitistatina de *Bitis arietans* y ocellatusina de *Echis ocellatus*

Juárez, P.¹, Sanz, L.¹, Wagstaff, S.C.², Harrison, R.S.² & Calvete, J.J.¹

¹Laboratorio de Proteinómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Email: pjuarez@ibv.csic.es

²Alistair Reid Venom Research Unit, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK

Serpientes y lagartos forman el orden de los reptiles escamosos (Squamata). Los venenos de las especies venenosas se formaron por reclutamiento y evolución acelerada de proteínas ordinarias. Las metaloproteasas dependientes de Zn^{+2} (SVMP) son toxinas modulares presentes en la familia Viperidae y se clasifican en PI-PIV en función de los dominios que las forman. Las disintegrinas (40-100 AAs) son liberadas al veneno por procesamiento proteolítico de las metaloproteasas PII y actúan inhibiendo la adhesión de las integrinas a sus ligandos. Se clasifican en función de su longitud y número de enlaces disulfuro en monoméricas largas (~90 AAs, 7 SS), medias (~70 AAs, 6 SS) y cortas (~40 AAs, 4 SS) y diméricas (subunidades de ~63 AAs, 2 SS Inter.- y 4 SS intracatenarios). Mediante combinación de técnicas de Química de Proteínas y Proteómica hemos establecido una ruta evolutiva para las disintegrinas basada en la pérdida sucesiva de enlaces disulfuro y el procesamiento proteolítico del extremo N-terminal. Analizando librerías de ADNc de glándulas de venenos de *Bitis arietans* y *Echis ocellatus* hemos descrito la existencia de precursores evolutivos de las disintegrinas bitistatina (larga) y ocellatusina (corta) que nos han permitido proponer mecanismos moleculares para la emergencia de estos grupos de disintegrinas. Además, mediante el análisis de la organización genómica de disintegrinas de las diferentes familias estructurales hemos demostrado que la diversificación estructural conlleva una minimización tanto de la estructura primaria como de la organización génica (pérdida de intrones).

Poster nº 3

Diseño del gen y expresión recombinante de lectinas de Diocleinae, una herramienta para estudios de estructura Cuaternaria.

Celso S. Nagano¹, Benildo S. Cavada², Líbia Sanz², Juan J. Calvete¹

¹Laboratorio de Proteinómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Email: naganocs@ibv.csic.es

²BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Ceará.

Las lectinas descifran los glicocódigos encriptados en las estructuras de los glicanos. La disposición espacial de los lugares de unión de azúcares es un elemento clave del reconocimiento específico de glicanos de la superficie celular. Las lectinas vegetales más estudiadas son las de la familia *Leguminosae*. Estas lectinas están compuestas por subunidades de unos 237 aminoácidos, cuyas estructuras primarias y terciarias están altamente conservadas. Sin embargo, las lectinas de leguminosas presentan gran variabilidad en sus estructuras cuaternarias así como en sus especificidades de unión a glicanos. La comparación de las estructuras cristalinas de las lectinas de *Dioclea guianensis* (1H9P) y *Dioclea grandiflora* (1DGL) sugieren un papel clave para el residuo 131 en la estabilización de la estructura tetramérica. Las lectinas que, como *Dioclea guianensis* (Dguia), presentan equilibrio dímero-tetramero dependiente del pH (pH-D/T), contienen la Asn131, mientras que aquellas que son tetraméricas en todo rango de pH (*Dioclea grandiflora* (DGL), cuya secuencia difiere en solo 3 residuos de la de Dguia) contienen His131. Para investigar los requerimientos estructurales que modulan el equilibrio D-T, hemos clonado genes sintéticos que codifican la cadena alfa de las lectinas Dguia y DGL. Las lectinas recombinantes se expresan en forma soluble, son activas y presentan (rDguia) o no (rDGL) pH-D/T en experimentos de equilibrio de sedimentación. Para estudiar la importancia del residuo 131 hemos producido mutantes de las dos lectinas que, si nuestra hipótesis es correcta, deben abolir o generar el equilibrio D-T. Hemos obtenido cristales de las lectinas silvestres y mutadas. Aunque la estructura cristalina del mutante puntual de rDguia N131H, a 1.65Å de resolución, presenta evidente densidad electrónica en la zona del bucle 117-123 y muestra interacciones homólogas entre subunidades opuestas del tetramero, el análisis de equilibrio de sedimentación mostró que las mutaciones N131H en rDguia y H131N en rDGL no abolieron o generaron, respectivamente, el equilibrio pH-D/T. Los resultados indican que el equilibrio pH-D/T no depende únicamente del residuo 131. Los 3 residuos distintos entre Dguia y DGL están ubicados en la región de interacciones dímero-dímero, sugiriendo que los residuos responsables del equilibrio pH-D/T deben corresponder a las posiciones 123, 131 y 132. Los dobles mutantes de rDGL (E123A-H131N y H131N-K132Q) presentaron el mismo comportamiento que rDGL-wt. Sin embargo, los mutantes de rDGL (E123A-K132Q y E123A-H131N-K132Q) presentaron equilibrio pH-D/T similar al de rDguia. Concluimos pues, que en la región de interacciones D-D, las mutaciones de residuos con cadena lateral cargada (carboxilo o amino) por aminoácidos de cadena lateral sin carga (E123/A, K132/Q) son responsables del equilibrio pH-D/T en rDGL. Las estructuras cristalinas de estos mutantes están siendo analizado en nuestro laboratorio.

Poster nº 4

Análisis transcriptómico de las respuestas de defensa de los frutos cítricos a la infección por *Penicillium digitatum*. Implicación del etileno.

Santiago Alamar¹, **Jose Gadea**², **Javier Forment**², **Lorenzo Zacarías**¹, **Luis González-Candelas**¹, y **Jose F. Marcos**¹

¹ Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC), Apartado Correos 73, Burjassot, 46100 Valencia; ² Laboratorio de Genómica. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC), Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia.

Correo electrónico: santiagoalamar@iata.csic.es

Las mayores pérdidas durante la postcosecha de frutos cítricos se deben a la infección por hongos, siendo *Penicillium digitatum* el de mayor incidencia. Dentro del proyecto español de genómica funcional de cítricos CFGP (<http://genomica.ibmcp.upv.es>) se ha diseñado una micromatriz con 12.672 clones procedentes de 18 colecciones de cDNAs obtenidas a partir de distintos tejidos, en diferentes estadios fisiológicos y en respuesta a diferentes tipos de estrés (Forment *et al.*, 2005). Con el objetivo de identificar genes implicados en la respuesta del fruto cítrico al proceso de infección, estas matrices se hibridaron con muestras de frutos control, frutos heridos o frutos heridos e infectados por *P. digitatum*. Se emplearon tres réplicas biológicas de cada muestra, recolectadas en diferentes campañas, y dos réplicas técnicas para cada una de ellas. Por otra parte, se ha confirmado la implicación del etileno durante el proceso de infección del fruto por *P. digitatum* y cómo esta hormona induce la expresión de determinados genes de defensa (Marcos *et al.*, 2005). Los dos pasos finales de la biosíntesis de etileno están catalizados por la ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), codificadas por complejas familias multigénicas en plantas. Hemos demostrado que existe una regulación diferencial de *ACS1*, *ACS2* y *ACO* en respuesta a herida e infección. Para estudiar el papel del etileno como mediador de los cambios de expresión génica durante estos procesos, hemos hibridado la micromatriz con muestras de frutos tratados con dicha hormona en ausencia de infección, y analizado los resultados conjuntamente con los anteriores.

Los análisis han permitido una asignación de genes con expresión diferencial en los distintos procesos estudiados. Se han identificado 889 genes con expresión diferencial por infección, herida y/o tratamiento con etileno (10,6% de un total de 8.384 analizados). Hay 301 genes inducidos por infección, de los cuales 102 (33,8%) lo son también por etileno, lo que sugiere que su expresión durante la infección probablemente está mediada por esta hormona.

La anotación funcional global de los resultados de expresión diferencial muestra la relevancia del metabolismo secundario en la respuesta a la infección, lo que confirma su implicación en la defensa del fruto frente a patógenos. Además, se ha analizado mediante hibridación Northern la expresión de determinados genes, confirmando su expresión diferencial. Los resultados sugieren mecanismos moleculares de respuesta del fruto cítrico a la infección por *P. digitatum*, y confirman que el etileno está actuando en este proceso.

Marcos, J. F., Gonzalez-Candelas, L., y Zacarias, L. (2005). *J. Exp. Bot.* 56 (418): 2183-2193.

Forment, J. Gadea, J. et al. (2005). *Plant Mol. Biol.* 57 (3): 375-391.

Poster nº 5

Cambios en la expresión génica y metabolismo de fenilpropanoides relacionados con la inducción de resistencia en los frutos cítricos frente a la infección por *Penicillium digitatum*.

Ana Rosa Ballester¹, M^a Teresa Lafuente¹, José Gadea², Javier Forment², Luis González-Candelas¹

¹Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Apdo. Correos 73. Burjassot 46100 - Valencia. ²Laboratorio de Genómica. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC). Avda. de los Naranjos s/n. 46022-Valencia.

E-mail: aballester@iata.csic.es

Una de las principales causas de pérdidas durante la postcosecha de los frutos cítricos son las podredumbres originadas por hongos del género *Penicillium*. En nuestro grupo estamos estudiando los procesos asociados a la resistencia inducida mediante la inoculación previa del patógeno seguido de la inactivación térmica del mismo. Este tratamiento reduce el porcentaje de infección causada por una inoculación posterior del hongo. Con el fin de conocer los mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* se empleó una micromatriz de cDNAs elaborada en el marco del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos que contiene 12.672 clones, procedentes de 18 genotecas construidas a partir de distintos tejidos de cítricos en diferentes estados fisiológicos y en respuesta a diversos estreses (Forment *et al.*, 2005). A partir de las hibridaciones con muestras de frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia se llevó a cabo la identificación de genes con expresión diferencial. El sistema inductor dio lugar a una variación significativa en el nivel de expresión de aproximadamente el 12% de los genes, aumentando 253 genes y reduciendo su expresión 559 genes. Cabe destacar la inducción de varios genes que codifican ACC oxidasas, O-metiltransferasas, una L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la proteína taumatina. En cambio, la infección *per se* indujo la expresión de 8 genes, de los cuales 2 pertenecen a la familia de las ácido salicílico metil transferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina, y redujo la expresión de 52 genes. En la micromatriz están depositados 66 genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides. De éstos, 12 se inducen como consecuencia del tratamiento inductor, entre los que cabe destacar aquellos que codifican varias O-metiltransferasas y una PAL, y 9 genes reducen su expresión, como es el caso de las peroxidasas. Sin embargo, la infección *per se* no varió de forma significativa la expresión de ningún gen implicado en esta ruta metabólica.

Teniendo en cuenta estos resultados se ha profundizado en el estudio del metabolismo de fenilpropanoides utilizando el análisis de la expresión génica mediante hibridación Northern y el análisis de fenoles por HPLC. A partir del análisis mediante hibridación Northern de 17 genes relevantes dentro de esta ruta metabólica se observó que el sistema inductor incrementó la acumulación del transcrito de genes que codifican una PAL, varias O-metiltransferasas, una sinapil alcohol deshidrogenasa, una cinamoil alcohol deshidrogenasa y una peroxidasa. Sin embargo, el nivel de expresión de estos genes fue mayor a la observada debida a la infección *per se*. El estudio se completó con el análisis de fenoles por HPLC, observándose que de 35 compuestos fenólicos mayoritarios detectados en los frutos cítricos por fluorescencia, 14 correspondieron a compuestos inducidos por el tratamiento. El cambio más relevante se observó en la escoparona y en la síntesis de dos furanocoumarinas. El tratamiento inductor no indujo cambios en compuestos mayoritarios como la hesperidina o la narirutina, pero sí que incrementó de forma transitoria la concentración de algunas flavonas polimetoxiladas. Forment, J. *et al.* (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57 (3): 375-391.

Control de la estabilidad de los mRNAs por la MAP quinasa Hog1.

Lorena Romero-Santacreu¹, José García-Martínez², Joaquín Moreno¹, José E. Pérez-Ortín^{1,2} y Paula M. Alepuz¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y ²Servicio de Chips de DNA-SCSIE. Universitat de València

Las MAP quinasas (MAPK) son componentes importantes en las rutas de transducción de señales externas en células eucariotas, y se encuentran conservadas desde levaduras hasta mamíferos. La MAPK p38 de mamíferos se activa por citocinas y señales de estrés y controla la expresión de más de 100 genes implicados en importantes procesos celulares como la inflamación, la proliferación y diferenciación celular y la apoptosis. Los cambios en la expresión génica llevados a cabo por p38 se producen mediante la inducción de la transcripción y también mediante la regulación de la estabilidad de los mRNAs. p38 tiene un homólogo en levadura, Hog1p, que se activa por estrés osmótico y afecta a la expresión de un gran número de genes. Hasta ahora se ha descrito que Hog1p regula el inicio de la transcripción, mediante la modificación de factores transcripcionales específicos y la unión a los promotores de los genes que regula donde recluta y activa el holoenzima de la polimerasa II. Dada la alta homología funcional y estructural entre las MAPKs p38 y Hog1p, nos planteamos si la MAPK Hog1p podría también controlar la respuesta transcripcional al estrés osmótico mediante la modulación de la estabilidad de mRNAs.

Para comprobar esa hipótesis, hemos llevado a cabo un detallado estudio cinético, a nivel genómico, de los cambios en la expresión génica que ocurren durante el estrés osmótico en células silvestres y mutantes para la MAPK Hog1p. Este trabajo se ha realizado mediante la técnica Genomic Run On (GRO), desarrollada recientemente por García *et al.*, 2004 (Molecular Cell, Vol. 15, 303–313). Esta técnica permite el cálculo de vidas medias para todos los genes de levadura en situaciones de cambios de la expresión génica, a partir de los datos de las cinéticas de tasa de transcripción (TR) y de cantidad de RNA mensajero (mRNA) para cada gen durante la respuesta al estrés. En este estudio hemos podido observar que alrededor del 10% de los genes presentan cambios en su expresión durante el choque osmótico. El 40% de estos genes ven aumentados sus niveles de mRNA y para la mayor parte de éstos, la inducción se pierde en el mutante *hog1*. El choque osmótico produce una drástica caída a los dos minutos en la tasa de transcripción global excepto en un grupo de genes implicados en la síntesis de glicerol, sugiriendo que estos genes tienen un mecanismo de activación diferente y más rápido que el resto. La recuperación de los niveles iniciales de transcripción global ocurre en células silvestres a los 15 minutos de estrés, siendo más lenta y parcial en las células mutantes *hog1*. Los genes que se inducen de manera dependiente de Hog1 muestran un perfil de TR diferente del resto de genes, presentando un incremento muy rápido y transitorio. Sin embargo, en el 30% de estos genes, el incremento en la TR no es pronunciado y, por el contrario, muestran importantes cambios en la estabilidad de sus mRNAs. Actualmente estamos investigando los mecanismos por los cuales la MAPK Hog1p modula la expresión génica mediante la regulación de la estabilidad de los mRNAs durante el estrés osmótico.

Poster nº 7

Transcriptome analysis of citrus transgenic overexpressing a GA 20-oxidase gene

Huerta L⁽¹⁾, Fagoaga C⁽²⁾, Pérez-Amador MA⁽¹⁾, Peña L⁽²⁾, García-Martínez JL⁽¹⁾

⁽¹⁾*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain*

⁽²⁾*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera de Moncada-Náquera, Km 4'5, 46113 Moncada, Valencia, Spain*

e-mail: lauhuema@ibmcp.upv.es

The gibberellin (GA) plant hormones are involved in many developmental processes, including internode elongation. GA 20-oxidase (GA20ox) is a key enzyme that catalyses regulatory steps of GA biosynthesis. It is possible to alter GA levels and, consequently, plant growth by modifying the expression of *GA20ox* genes. In previous work, we have generated Carrizo citrange plants that constitutively express either sense or antisense copies of *CcGA20ox1* (a *GA20ox* gene from Carrizo) and showed a slender or semi-darf phenotype as a result of elevated or reduced GA levels, respectively (Fagoaga *et al.*, 2003).

To improve our understanding on the role of GAs in internode elongation we investigated how Carrizo citrange transgenic plants are affected in terms of gene expression using a citrus cDNA microarray, previously produced in our laboratory representing 6875 putative unigenes (Forment *et al.*, 2005). Comparison of gene expression patterns between developing internodes of control and citrus plants overexpressing sense *CcGA20ox1* revealed that 786 unigenes were differentially expressed to a significant degree. The set of upregulated genes were analyzed for over-enrichment of functional gene classes using FatiGO. The functional groups of genes corresponding to photosynthesis (light reaction), carbon utilization by fixation of CO₂ and response to water deprivation were enriched suggesting that GA may regulate these processes. The increased expression of genes involved in fixation of CO₂ led to increased net photosynthesis in sense plants. Finally, we analyzed if some of the up-regulated genes respond rapidly to GA application using internode explants subjected to 24 h GA₃ treatment.

Fagoaga C, Vidal A, Pina JA, Lliso I, Tadeo FR, Talón M, García-Martínez JL, Navarro L, Peña L. 2003. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. 7th International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona.

Forment J, Gadea J, Huerta L, et al. 2005. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant. Mol. Biol.*, 57(3): 375-391.

Poster nº 8

“CHILLPEACH”: una base de datos de genómica funcional para el estudio del daño por frío en melocotón

C. Martí¹, T.M. Gradziel², J. Forment¹, C.P. Peace², C.H. Crisosto² y A. Granell¹

¹IBMCP-CSIC Universidad Politécnica de Valencia ²Department of Plant Sciences University of California, Davies, CA USA.

Se ha generado una colección de ESTs de mesocarpo de melocotón (*Prunus persica*) enriquecida en cDNAs de longitud completa, provenientes de variedades sensibles y tolerantes al daño por frío. Con el fin de evitar la clonación reiterada de cDNAs pertenecientes a genes cuya expresión es alta, el cDNA se sometió a un proceso de normalización. Tanto las secuencias como el correspondiente análisis bioinformático han sido depositados en la base de datos CHILLPEACH que incluye: 1) Los resultados del procesamiento y ensamblaje de los ESTs (redundancia de los clones de cDNA y las secuencias consenso de los unigenes), 2) la anotación funcional (resultado del BLAST, anotación GO, dominios PFAM, etc, y 3) características de las secuencias (presencia de SNPs o SSRs). De las 8432 secuencias disponibles en la actualidad (genotecas PP1 más PPN), se han identificado 4468 unigenes que se agrupan en 2988 singletons y 1480 contigs. Los unigenes con ortólogo en *Arabidopsis* fueron clasificados en categorías funcionales según la anotación GO. Un análisis estadístico más exhaustivo de los clones mostró que alrededor del 50% de los unigenes en los que se inscriben, no han sido descritos aún en *Prunus* y que de las secuencias restantes, el 60% de ellas son más largas en la zona 5' del cDNA que las depositadas en los bancos de datos. Cuando estos unigenes fueron comparados con las secuencias de *A. thaliana* depositadas en la base de datos TAIR pep, se comprobó que el 23% de ellos no presentaba homología con ningún gen conocido. Respecto a los unigenes con ortólogo en *Arabidopsis*, el 50% corresponderían a cDNAs de longitud completa.

De otro lado, esta colección de cDNAs posee el valor añadido de haber sido clonado en un vector GATEway, facilitando su posterior subclonación en vectores tanto de expresión como de silenciamiento génico posibilitando un ensayo de la función génica más sencillo. Este proyecto también incluye la generación de un microarray con la colección de unigenes obtenidos y su utilización para el estudio e identificación de cambios a nivel transcripcional asociados al daño por frío.

Poster nº 9

Servicio de Proteómica de la Universidad de Alicante

Bru, R.¹; Vilella-Antón, M.T.¹; Diaz-Gonzalez, S.²; Candela, P.²; Beltrá, A.P.²; Gómez, M.C.²

¹Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas, Dto. Agroquímica y Bioquímica, Fac. Ciencias, Unv. Alicante, Ap 99, 03080 Alicante

²Servicios Técnicos de Investigación, Unv. Alicante, Ap 99, 03080 Alicante

e-mail: Roque.Bru@ua.es

Se presenta la composición, estructura y servicios ofertados por el Servicio de Proteómica de la Universidad de Alicante. Dicho servicio se encuentra asociado al Instituto Nacional de Proteómica PROTEORED formando parte del Nodo 5 coordinado por el CIPF.

Poster nº 10

PROTEOMICA COMO METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE PERFILES Y DIANAS EN LA LLC-B. ANALISIS DE RESULTADOS.

M. Marín^{1,2}, C. Reinoso³, E. Jantus³ L. Sanz², I. Benet¹, R. Farras³, J. J. Calvete², J. García-Conde^{3,4}.

(1) Hospital Clínico Universitario de Valencia, VALENCIA, ESPAÑA

(2) Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, VALENCIA, ESPAÑA

(3) Centro de Investigación Príncipe Felipe. VALENCIA, ESPAÑA

(4) Universidad de Valencia, VALENCIA, ESPAÑA

Introducción: La leucemia linfática crónica B (LLC-B) es un síndrome linfoproliferativo crónico con pacientes que presentan un curso clínico heterogéneo. Se han identificado diversos factores pronóstico, como mutaciones en la región variable del gen de las inmunoglobulinas IgVH, mutaciones somáticas del gen BCL6 en un 20-25% de los casos, o el nivel de expresión de los marcadores CD38 y ZAP70.

La combinación de la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas permite por un lado la determinación de aquellas proteínas con expresión diferencial cuando se comparan dos grupos de pacientes y además la identificación inequívoca de estas proteínas.

Objetivo: Caracterizar el perfil proteómico de los grupos de pacientes con LLC-B, para la mejor catalogación de estos grupos y profundizar en el conocimiento de las alteraciones moleculares asociadas.

Pacientes y metodología: Se estudiaron 39 muestras de pacientes con LLC-B, 15 con mutaciones en IgVH pero no en BCL6 (G1), 10 con mutaciones en IgVH y BCL6 (G2), y 14 sin mutaciones (G3). La expresión de CD38 y ZAP 70 era elevada en 12 y 15 pacientes, respectivamente. 100 µg de proteína total obtenidas a partir de linfocitos B fueron sometidas a isoelectroenfoque y posterior segunda dimensión mediante SDS-PAGE. La adquisición y análisis de imagen se realizó con el programa LUDESI (<http://www.ludesi.com>) obteniendo las manchas con expresión diferencial. Las proteínas seleccionadas fueron identificadas mediante huella peptídica por MALDI-TOF MS (Voyager DE-Pro). Para confirmar la identificación inicial, se realizó secuenciación mediante Disociación Inducida por Colisión (CID). Las proteínas así identificadas se validan mediante Western blot con anticuerpos monoclonales y quimioluminiscencia

Resultados:

Proteínas diferencialmente expresadas: Se obtuvieron un total de 72 proteínas con expresión diferencial en las seis comparaciones realizadas, cuatro en función del estado mutacional de IgVH y BCL6, y las correspondientes a la expresión de CD38 y ZAP70, los resultados obtenidos pueden observarse en la siguiente tabla 1.

Identificación de Proteínas: Se han identificado un 60% de las proteínas diferencialmente expresadas (alguna de las cuales son: S100A9, SOD1, LDHA, GDIS, VIME, VAS1), mediante combinación de huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación peptídica.

Conclusiones: La aplicación de la proteómica al estudio de los pacientes con LLC-B ha permitido la identificación de diversas proteínas con expresión diferencial atendiendo a las características de los pacientes analizados. La identificación y validación de estas proteínas permite caracterizar inequívocamente marcadores moleculares de diagnóstico, pronóstico o evolución de la enfermedad.

Proyecto financiado por el Fondo de Investigación Sanitario, Instituto de Salud Carlos III, expedientes G03/179, FIS PI020889 Y FIS PI051001

Poster nº 11

La tiolutina es un inhibidor de la degradación del mRNA en *Saccharomyces cerevisiae*

Vicent Pelechano y José E. Pérez-Ortín

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València. C/ Dr. Moliner 50. E46100. Burjassot. (jose.e.perez@uv.es)

La tiolutina se usa habitualmente como bloqueante de la transcripción en levadura y otros eucariotas. Su uso más frecuente es para experimentos de medición de vidas medias de RNA mensajeros. Este tipo de experimentos es un método alternativo al uso de mutantes termosensibles de la RNA pol II pues tiene la ventaja de que no se somete a estrés térmico a las células y se puede usar cualquier cepa de levadura.

Hemos encontrado que, además de un inhibidor de la transcripción, la tiolutina es también un inhibidor de la degradación del mRNA, especialmente a concentraciones superiores a 3 µg/mL. Este efecto es variable según cepas pero provoca un error en la medición de la vida media de los mRNAs. Resulta necesario, pues, determinar la concentración adecuada de tiolutina para experimentos de cálculo de vidas medias en cada cepa.

La inhibición de la degradación sucede después del recorte de la cola poli(A) y es de diferente cuantía según el gen. Los mRNAs de genes del mismo grupo funcional se afectan de forma similar lo que sugiere que las diversas rutas de degradación de los mensajeros tienen diferente importancia para cada grupo funcional.

Poster nº 12

GEPAS

David Montaner^{1,2*}, Joaquín Tárraga^{1,2}, Jaime Huerta-Cepas^{1,2}, Jordi Burguet¹, Juan M. Vaquerizas¹, Lucía Conde¹, Pablo Minguez¹, Eva Alloza¹, Fátima Al-Shahrour¹, Ignacio Medina¹, Joaquín Dopazo^{1,2}

1. Departamento de Bioinformática, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Autopista del Saler 16, E46013, Valencia.

2. Nodo de Genómica Funcional, INB, CIPF, Autopista del Saler 16, E46013, Valencia.

GEPAS (Gene Expression Profile Analysis Suite; www.gepas.org) es una herramienta web expresamente diseñada para el análisis de datos de Microarrays. Cualquier interesado puede hacer uso de ella libremente, utilizando tan solo un navegador de Internet. Su utilización es extremadamente simple ya que además de no necesitar ningún tipo de instalación o actualización puede manejarse mediante una interfaz grafica tan sencilla como intuitiva. GEPAS ha estado disponible ininterrumpidamente durante mas de cuatro años, adaptándose en todo momento a las necesidades de su comunidad de usuarios así como a la siempre cambiante tecnología de microarrays.

GEPAS esta organizado en varios módulos independientes, permitiendo al investigador realizar un análisis o tratamiento de los datos rápido y puntual; pero además, la interconexión de todos los módulos dentro de un único entorno, da la posibilidad de realizar un completo tratamiento y análisis de los datos. GEPAS puede leer los datos crudos que resultan de los scanner y plataformas mas comúnmente utilizados, proveyendo una amplia gama de herramientas para su inspección, normalización y preprocesamiento. Una vez el investigador cuenta con datos normalizados puede fácilmente utilizarlos para estudiar la expresión diferencial de genes en diversos contextos como por ejemplo el análisis de diferencias entre dos o mas clases, la relación de la explosión de los genes con variables continuas asociadas a los experimentos o el análisis de supervivencia. GEPAS también implementa los algoritmos de clusterig mas eficientes en el contexto de microarrays a la vez que facilita una herramienta única para el manejo y visualización de los clusters o árboles resultantes, haciendo inteligibles los siempre difíciles de interpretar resultados del clustering. GEPAS cuenta también con un módulo del clasificación supervisada que, utilizando diversas metodologías tanto de selección de genes como de modelización matemática, permite la construcción de clasificadores óptimos así como su utilización en nuevas muestras.

Todos estos y otros módulos de análisis de datos de microarrays se complementan con una presentación de resultados diseñada para que su interpretación biológica sea directa y sencilla. Además la interconexión entre los módulos de GEPAS se extiende al proyecto Bableomics que permite recopilar información disponible en bases de datos de todo el mundo e incorporarla en el análisis de datos de microarrays.

Referencias:

Montaner D., Tárraga J., Huerta-Cepas J., Burguet J., Vaquerizas J.M., Conde L., Minguez P., Vera J., Mukherjee S., Valls J., Pujana M., Alloza E., Herrero J., Al-Shahrour F., Dopazo J.

Next station in microarray data analysis: GEPAS

Nucl Acids Res., 2006, **34**: W486-W491

Al-Shahrour F., Minguez P., Tárraga J., Montaner D., Alloza E., Vaquerizas J.M., Conde L., Blaschke C., Vera J. and Dopazo J.

BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments

Nucl Acids Res., 2006, **34**: W472-W476

Poster nº 13

Cambios en la expresión génica y metabolismo de fenilpropanoides relacionados con la inducción de resistencia en los frutos cítricos frente a la infección por *Penicillium digitatum*.

Ana Rosa Ballester¹, M^a Teresa Lafuente¹, José Gadea², Javier Forment², Luis González-Candelas¹

¹Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Apdo. Correos 73. Burjassot 46100 - Valencia. ²Laboratorio de Genómica. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC). Avda. de los Naranjos s/n. 46022-Valencia.

E-mail: aballester@iata.csic.es

Una de las principales causas de pérdidas durante la postcosecha de los frutos cítricos son las podredumbres originadas por hongos del género *Penicillium*. En nuestro grupo estamos estudiando los procesos asociados a la resistencia inducida mediante la inoculación previa del patógeno seguido de la inactivación térmica del mismo. Este tratamiento reduce el porcentaje de infección causada por una inoculación posterior del hongo. Con el fin de conocer los mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* se empleó una micromatriz de cDNAs elaborada en el marco del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos que contiene 12.672 clones, procedentes de 18 genotecas construidas a partir de distintos tejidos de cítricos en diferentes estados fisiológicos y en respuesta a diversos estreses (Forment *et al.*, 2005). A partir de las hibridaciones con muestras de frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia se llevó a cabo la identificación de genes con expresión diferencial. El sistema inductor dio lugar a una variación significativa en el nivel de expresión de aproximadamente el 12% de los genes, aumentando 253 genes y reduciendo su expresión 559 genes. Cabe destacar la inducción de varios genes que codifican ACC oxidasas, O-metiltransferasas, una L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la proteína taumatina. En cambio, la infección *per se* indujo la expresión de 8 genes, de los cuales 2 pertenecen a la familia de las ácido salicílico metil transferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina, y redujo la expresión de 52 genes. En la micromatriz están depositados 66 genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides. De éstos, 12 se inducen como consecuencia del tratamiento inductor, entre los que cabe destacar aquellos que codifican varias O-metiltransferasas y una PAL, y 9 genes reducen su expresión, como es el caso de las peroxidasas. Sin embargo, la infección *per se* no varió de forma significativa la expresión de ningún gen implicado en esta ruta metabólica.

Teniendo en cuenta estos resultados se ha profundizado en el estudio del metabolismo de fenilpropanoides utilizando el análisis de la expresión génica mediante hibridación Northern y el análisis de fenoles por HPLC. A partir del análisis mediante hibridación Northern de 17 genes relevantes dentro de esta ruta metabólica se observó que el sistema inductor incrementó la acumulación del transcrito de genes que codifican una PAL, varias O-metiltransferasas, una sinapil alcohol deshidrogenasa, una cinamoil alcohol deshidrogenasa y una peroxidasa. Sin embargo, el nivel de expresión de estos genes fue mayor a la observada debida a la infección *per se*. El estudio se completó con el análisis de fenoles por HPLC, observándose que de 35 compuestos fenólicos mayoritarios detectados en los frutos cítricos por fluorescencia, 14 correspondieron a compuestos inducidos por el tratamiento. El cambio más relevante se observó en la escoparona y en la síntesis de dos furanocoumarinas. El tratamiento inductor no indujo cambios en compuestos mayoritarios como la hesperidina o la narirutina, pero sí que incrementó de forma transitoria la concentración de algunas flavonas polimetoxiladas. Forment, J. *et al.* (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57 (3): 375-391.

Análisis transcriptómico mediante una micromatriz dedicada (Chillma), de los mecanismos moleculares subyacentes al "daño por frío" y de "tolerancia al frío" en frutos de clementina almacenados a bajas temperaturas

C. Pons Puig*, C. Royo Bru*, Y. Lluch Gomez*§, J. Gadea Vacas*, J. Forment Mollet* A.K. Kanellis◇, L. Zacarias Garcia§, M.T. Lafuente Rodriguez§ y A. Granell Richart*

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV/CSIC). València.

§Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos (CSIC). València.

◇Aristotele University of Thessalonika. Thessalonika. Grecia

Resumen

Los cítricos son especies originarias de Asia, introducidas y cultivadas en numerosos países de clima cálido. En la península ibérica se cultivan en las costas mediterránea y atlántica, donde están expuestos periódicamente a bajas temperaturas. Los frutos cítricos son especialmente sensibles a temperaturas inferiores a 8-10° C, tanto en el árbol como durante la poscosecha. En el caso de las mandarinas, las bajas temperaturas producen daño en el pericarpio (flavedo) de cultivares tales como ‘Fortune’ (Vercher 1994) o Encore (Vitor 1999). El daño por frío (CI) se manifiesta como pardeamientos, necrosis y depresiones del flavedo (“pitting”). Entender la respuesta molecular del fruto al almacenamiento prolongado a bajas temperaturas y diseñar estrategias para mejorar la calidad del fruto durante la poscosecha es por tanto uno de los objetivos fundamentales de la industria cítrica. En nuestro grupo estamos especialmente interesados en los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de la calidad externa del fruto durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Para ello, hemos desarrollado una micromatriz de cDNA de flavedo (chillma) para ser utilizada en experimentos dirigidos a entender la respuesta del flavedo de los cítricos a diferentes condiciones de almacenamiento durante la poscosecha. La micromatriz se ha utilizado para evaluar los cambios en los niveles de expresión de los mensajeros representados en la micromatriz durante el almacenamiento a 2° y 12°C de frutos de mandarina del cultivar sensible al frío ‘Fortune’ (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka x *C. reticulata*. Blanco). Los perfiles de expresión obtenidos en ‘Fortune’ se han comparado con los obtenidos para el cultivar tolerante ‘Hernandina’ (*C. clementina* Hort. Ex Tanaka) a 2° C. Los patrones de expresión se han caracterizado funcionalmente. El estudio comparativo ha permitido identificar componentes de los programas moleculares que están operando en el flavedo de ambos cultivares y que conducen al desarrollo del daño o tolerancia en estas mandarinas.

Poster nº 15

Análisis transcriptómico del desarrollo y la senescencia del pistilo de *Arabidopsis thaliana*.

PABLO CARBONELL, JUAN CARBONELL, ANTONIO GRANELL Y MIGUEL A. PÉREZ-AMADOR.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica-CSIC, Avda. de los Naranjos s/n, 46022 Valencia.

El pistilo es el órgano reproductivo femenino de las Angiospermas, siendo su función la de albergar los óvulos, facilitar la polinización y guiar el crecimiento de los tubos polínicos. En la mayoría de las especies, tras la fecundación de los óvulos, el pistilo se transforma en el fruto, donde tiene lugar el desarrollo de las semillas. Sin embargo, en ausencia de la fecundación, el pistilo continúa con un programa de desarrollo alternativo al de la fructificación, que finaliza en la senescencia del órgano, permitiendo a la planta recuperar nutrientes y energía.

En este trabajo se realiza un análisis de la expresión génica que tiene lugar durante el desarrollo y senescencia del pistilo, mediante micromatrices de oligonucleótidos largos (70-mer) de Operon (Arabidopsis Genome Oligo Set Version 1.0). Este conjunto de oligonucleótidos representa el genoma completo de Arabidopsis, con 26,090 oligonucleótidos. Para obtener pistilos no fertilizados se trabaja con el mutante *cer6-2* que presenta esterilidad masculina condicional. El análisis denota cambio significativo en los niveles de expresión de 2,700 genes. Este elevado número de genes es indicativo de la complejidad de la transición que sufre el pistilo desde el momento en que está preparado para ser polinizado hasta su entrada en senescencia en ausencia de fertilización. Dos días después de la anthesis, diferentes estructuras del pistilo han entrado en senescencia, reflejado en cambios de expresión génica, especialmente la inducción de genes de senescencia, y en la pérdida de la capacidad de desarrollar frutos partenocárpicos en respuesta a la aplicación de ácido giberélico. El etileno parece ser un regulador implicado en la entrada en senescencia del pistilo teniendo en cuenta cambios en niveles de expresión de genes de biosíntesis y de respuesta.

Poster nº 16

Métodos estadísticos para el análisis e interpretación de cinéticas múltiples en experimentos de transcriptómica.

Ana Conesa¹, M.J. Nueda², A. Ferrer³ y Manuel Talón¹

¹Centro de Genómica . Insittuto Valenciano de Investigaciones Agrarias

²Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universidad de Alicante

³Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universidad Politécnica de Valencia

La tecnología de microarrays se está imponiendo en el estudio de multitud de procesos y sistemas biológicos. Aparte de aplicaciones iniciales en clasificación de tumores o caracterización del ciclo celular, muchos laboratorios utilizan esta tecnología para el entendimiento del mecanismo de expresión génica asociado a procesos fisiológicos o respuestas a estímulos. Este tipo de aproximaciones frecuentemente conllevan experimentos con componentes temporales y de tratamiento o desarrollo. El resultado son diseños de experimentos de cinéticas con varios grupos experimentales. En este tipo de experimentos, la dificultad en aplicar una suficiente replicación de datos, la multitud de factores y sus posibles interacciones, así como la abundancia de variables analizadas, hacen arduo el abordaje estadístico de los datos. En esta charla se presenta diversas aproximaciones para el análisis estadístico de datos de series temporales con múltiples grupos experimentales. Dichas aproximaciones (maSigPro y maSigPro-SCA) comprenden y combinan métodos de modelado de tendencias de expresión y análisis de diferencias, con técnicas multivariantes que permiten extraer los principales patrones de variabilidad en los datos y ofrecer métodos potentes de filtrado de ruido y de interpretación de resultados. Los métodos se presentarán tanto sobre sets de datos reales como con simulaciones *in silico*.

Poster nº 17

Transcriptome analysis of *Citrus* mutants with altered fragrance

Esther Carrera¹, Omar Ruíz Rivero¹, Domingo J. Iglesias¹, M^a Jesús Rodrigo², Lorenzo Zararías², and Manuel Talón¹

¹Centro de Genómica — IVIA, Carretera Moncada Náquera, Km 4.5. 46113 Moncada — Valencia (Spain).

²Instituto de Agroquímica de Alimentos (IATA). 46110 Burjassot — Valencia (Spain). E-mail: ecarrera@ivia.es; oruiz@ivia.es

Oranges are one of the most important Mediterranean-grown citrus species and its fruit, rich in vitamin C and flavonoids, is of great economical importance. Oranges and clementines are by far the most important exports of arable crops in Spain. It is clear that genetic improvement of citrus fruit has the potential to make a very significant contribution to the sustainable development of sector. Valencian Institute for Agricultural Research (IVIA) has several non-GM mutant collections of orange and clementine trees, which constitute a valuable material for the identification and characterisation of genes related to fruit quality. Here, we report on the isolation and preliminary characterisation of an orange mutant with altered fragrance. Transcriptome analysis of fruits from the I49 mutant showed changes of expression profile of genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of volatile compounds. Furthermore, volatile metabolite profile suggests that I49 mutant is indeed impaired in the biosynthesis of volatile compounds implicated in flower and fruit aroma formation.

We identified several genes, with different biological functions, down regulated in fruits of I49 mutant which did not exhibit any changes of expression in leaves. Genes coding for a Terpene synthase (TPS) and an O-Methyltransferase (OMT), with putative functions in secondary metabolism of volatile compounds, showed the major differences of expression (repression ratio higher than 5 fold and p-value <0.001). Interestingly, down regulation of both genes TPS and OMT can be directly related to loss of fragrance of fruits and flowers of I49 mutant.

There is evidence for sesquiterpene synthase-encoding gene (*Cstps1*) involved in aroma formation of Valencia orange fruits (Sharon-Asa et al., 2003), and O-Methyltransferases in the formation of major phenolic methyl ether compounds of rose flower scent (Scalliet et al., 2006). Expression of genes coding for a putative TPS and OMT were quantified. Results obtained from Real Time RT-PCR showed that both genes were highly expressed in fruits of wild type plants and down regulated in fruits of I49 mutant. Basal expression of both genes in leaves was not significantly affected.

Interestingly, mono- and sesquiterpenes are one of the most important groups of secondary metabolites involved in flower and fruit aroma (Guterman et al., 2002; Lückner et al., 2004; Tholl, 2006). Quantification of volatile compounds revealed a reduction of emission of several terpenoids and aromatic compounds in the headspace of flowers and green fruits from I49 mutant compared to wild type plants.

Poster nº 18

Cambios en la expresión génica asociados a la adquisición de tolerancia al frío en los frutos cítricos

Beatriz Establés-Ortiz¹, M^a Teresa Lafuente¹, Javier Forment², José Gadea², Luis González-Candelas¹.

¹Grupo de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Apdo. Correos 73, 46100, Burjassot (Valencia). ²Laboratorio de Genómica. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC), Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia.

E-mail: bestables@iata.csic.es

Algunos cultivares de cítricos, entre ellos la variedad de mandarina ‘Fortune’, desarrollan daños de frío (DF) cuando se exponen a temperaturas de 1°C. Los síntomas de DF se hacen visibles a partir de los 14 días de almacenamiento y se manifiestan como picado y áreas de color pardo en la parte más externa de la corteza o flavedo. La exposición previa durante 3 días a 37°C y 90% de humedad relativa (HR) previene la aparición de DF cuando los frutos se almacenan a 1°C. Para profundizar en el conocimiento de las respuestas tempranas y tardías asociadas con la tolerancia al frío adquirida mediante el tratamiento a altas temperaturas, se construyó una biblioteca de cDNAs de flavedo de frutos de mandarina ‘Fortune’ sometidos desde 4 horas hasta 3 días a un tratamiento de acondicionamiento térmico a 37°C y almacenados posteriormente hasta 10 días en frío. Del análisis de 1056 clones se identificaron 50 ESTs que presentaban homología con distintos factores de transcripción, de los cuales se seleccionaron 22 para profundizar en el estudio de su patrón de expresión mediante análisis Northern. De estos factores de transcripción, 5 podrían estar asociados con el efecto beneficioso del tratamiento de curado incrementando la tolerancia al frío de las mandarinas ‘Fortune’ y codifican proteínas del complejo TFIID y de la familia WRKY. Además, se identificaron otros que respondían fundamentalmente al frío entre los que se encontraron 4 genes que codificaban proteínas tipo ‘zinc finger’, un MYB y un ARF, que aumentó con el DF. En una aproximación complementaria, se llevaron a cabo experimentos de hibridación de micromatrices de cDNA que contienen 12672 clones, que representan 6675 unigenes, de la colección del Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) (Forment *et al.* 2005; <http://genomica.ibmcp.upv.es>). Se estudiaron 4 condiciones diferentes: frutos recién traídos de campo (RTC), frutos acondicionados 3 días a 37°C (C) y frutos almacenados 20 días a 2°C acondicionados (C+F) y sin acondicionar (F). El análisis estadístico reveló que alrededor del 40% de los genes analizados mostraron una expresión diferencial al menos en alguna de las 3 situaciones estudiadas respecto a los frutos RTC, aunque los cambios más importantes de expresión se produjeron en respuesta a la combinación de calor y frío. Entre los genes con mayor nivel de expresión en los frutos curados y almacenados a 2°C respecto a los frutos expuestos directamente al frío (C+F>F), se encuentran genes que codifican proteínas de la familia de las quitinasas, proteínas de unión al RNA ricas en residuos de glicina así como otras de estrés oxidativo como una ferritina y una alternativa oxidasa. Por otro lado, entre aquellos con mayor nivel de expresión en frutos almacenados directamente en frío (C+F<F) destacan 2 citocromos P450, 3 proteínas LEA y diversos genes que codifican enzimas de pared celular como una poligalacturonasa, una beta-xilosidasa y una exostosina. Además, dentro de este grupo se identificaron genes que codifican proteínas de choque térmico así como glucosidasas, lipasas y proteasas. El análisis funcional (FatiGO+) por ontologías génicas reveló que la tolerancia al frío inducida por el acondicionamiento de los frutos a 37°C está relacionada con el metabolismo de derivados de aminoácidos y con procesos de transcripción y su regulación.

Forment J *et al.* (2005) Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology* 57, 375-391.

Poster nº 19

BABELOMICS: métodos para la interpretación funcional de experimentos de escala genómica.

Fátima Al-Shahrour¹, Pablo Minguéz¹, Joaquín Tárraga^{1,2}, David Montaner^{1,2}, Eva Alloza¹, Juan M. Vaquerizas¹, Lucía Conde¹, and Joaquín Dopazo^{1,2,*}

¹ Bioinformatics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) Autopista del Saler 16, E-46013, Valencia, Spain ² Functional Genomics Node, INB CIPF, Autopista del Saler 16, E-46013, Valencia, Spain

Bajo una perspectiva de Biología de Sistemas, presentamos Babelomics, una suite de herramientas web para el análisis funcional de experimentos de escala genómica. Babelomics incluye el uso de información biológica como términos de Gene Ontology, rutas de KEGG, *Keywords* de la base de datos de proteínas Swissprot, sitios de unión de factores de transcripción, presencia en tejidos con características histológicas específicas y otros términos como motivos regulatorios de Cisred o bio-entidades obtenidas por procedimientos de *text-mining*.

Babelomics implementa diferentes procedimientos para la interpretación funcional de conjuntos de genes pre-seleccionados por algún valor o medida experimental. Se pueden emplear la información biológica almacenada en la base de datos de Babelomics para testar si existe algún enriquecimiento funcional significativo cuando se testa un grupo de genes de interés frente a un conjunto de genes de referencia. Las herramientas incluidas en Babelomics con ese objetivo son: FatiGO+, FatiGO, Tissues Mining Tool y Marmite.

Además, Babelomics incluye otras herramientas que emplean métodos alternativos basados en el estudio del comportamiento coordinado de grupos de genes funcionalmente relacionados. Estas herramientas son FatiScan y GSEA y permiten testar hipótesis inspiradas en Biología de Sistemas en donde se tiene en cuenta el papel coordinado de los genes y no sólo su comportamiento individual. Babelomics está disponible en <http://www.babelomics.org>.

Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tárraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J.M.M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. & Dopazo, J. (2006), BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments, *Nucleic Acids Research*, 34, W472-W476

Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2005), Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information, *Bioinformatics*, 21, 2988-2993.

Al-Shahrour, F. & Dopazo, (2005), Ontologies and functional genomics., *Data analysis and visualisation in genomics and proteomics*, Wiley. Ed. F. Azuaje and J. Dopazo, 99-102

Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Vaquerizas, J.M., Conde, L. & Dopazo, J. (2005), Babelomics: a suite of web-tools for functional annotation and analysis of group of genes in high-throughput experiments, *Nucleic Acids Research*, 33, W460-W464

Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2004), FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes, *Bioinformatics*, 20, 578-580.

Poster nº 20

Alteraciones en el proteoma del miocardio asociadas a la cardiopatía hipertensiva.

Aguado Velasco, C.¹, Valero, L.¹, Dionís, E.¹, González Miqueo, A.², Ravassa, S.² y Sánchez del Pino, M.M.¹

1) Laboratorio de Proteómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia; 2) Centro para la Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona.

La cardiopatía hipertensiva es la primera causa de insuficiencia cardíaca que, a su vez, es una de las principales causas de mortalidad en los países occidentales. A pesar de los enormes esfuerzos y avances en el conocimiento de estas patologías, todavía no se dispone de marcadores diagnósticos adecuados, ni de tratamientos eficaces para prevenir la insuficiencia cardíaca asociada a la cardiopatía hipertensiva. Aunque no se conocen bien los mecanismos moleculares que intervienen en el deterioro de la función miocárdica de los pacientes con hipertensión arterial, el remodelado miocárdico, molecular y estructural, media la transición de la hipertrofia compensadora a la insuficiencia cardíaca en estos pacientes. Indudablemente, este cambio del fenotipo celular está originado por alteraciones en el proteoma. Hemos empleado la metodología DIGE para estudiar los cambios en los niveles de expresión de proteínas de miocardio del modelo animal de la rata espontáneamente hipertensa. Se han detectado cambios estadísticamente significativos en más de 400 *spots*. Estamos identificando las proteínas implicadas mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF y LC/MS/MS. Hasta el momento, hemos identificado alrededor de 70 proteínas distintas correspondientes a más de 100 *spots* diferenciales. La naturaleza y posibles implicaciones de estas alteraciones se están analizando mediante el empleo de herramientas bioinformáticas.

Poster nº 21

ANALISIS BIOINFORMATICO DE LRRK2

Sánchez-Mut, J.V.¹; Gabaldón, T.²; Dopazo, H.²; Pérez-Tur, J.¹

1. Unidad de Genética Molecular. Instituto de Biomedicina de Valencia–CSIC.
2. Unidad de Genómica Comparada y Farmacogenómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo occidental afectando al 1-2% de los mayores de 65 años, siendo entre el 5-10% formas familiares.

En este trabajo abordamos el estudio bioinformático de LRRK2. Este gen inicialmente acotado por Funayama ha sido identificado recientemente (Paisán-Ruiz et al. 2004; Zimprich et al. 2004). Aunque la bibliografía sobre LRRK2 a crecido exponencialmente su composición de dominios y sus relaciones filogenéticas no han sido correctamente establecidas.

Hemos identificado 7 dominios a lo largo de toda la secuencia aminoacídica (14 repeticiones ARM-like; 5 repeticiones ANK-like; 14 repeticiones LRR-like; dominio ROC; dominio COR; dominio MAP3K; dominio WD40).

Además, hemos establecido por primera vez las relaciones filogenéticas completas de la proteína. Incluyendo en nuestro análisis miembros de los grupos Archaea, Eubacteria, Viridiplantae, Ecdysozoa y Metazoa. Para ello nos hemos servido tanto de métodos de distancias, como de máxima verosimilitud y bayesianos.

Realizamos también una inferencia funcional sobre los parálogos y ortólogos de LRRK2 con el fin de aportar más datos para una posible elección de un modelo experimental posterior.

Poster nº 22

DESARROLLO DE BIOMARCADORES DE TOXICIDAD EN PECES MEDIANTE APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

I.VARÓ, DEL RAMO, J., TORREBLANCA, A

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física, Universitat de València, Dr. Moliner 50, 46100
Burjassot, València

Uno de los mayores problemas que amenaza la producción intensiva en jaulas de peces marinos en general, y de dorada en particular, es la aparición de patologías infecciosas que pueden mermar la producción con las consiguientes pérdidas económicas. El desarrollo de los cultivos intensivos ha dado lugar a un aumento en el uso de compuestos bacteriostáticos y desinfectantes para controlar y prevenir las enfermedades debidas a bacterias y parásitos. El sulfato de cobre es utilizado habitualmente, en forma de baño, como tratamiento desinfectante curativo o preventivo contra protozoos ectoparásitos del género *Cryptocaryum* y *Amyloodinium*, y bacterias filamentosas en alevines de dorada. El cobre puede ser tóxico para los peces, de forma que el tratamiento con cobre puede comprometer su correcto crecimiento y desarrollo, e incrementar la mortalidad. Es importante evaluar los efectos del sulfato de cobre, desde el punto de vista de su toxicidad, en fases tempranas de desarrollo, por las posibles repercusiones de producción en acuicultura. El objetivo de este estudio ha sido investigar los efectos sub-letales del sulfato de cobre en alevines de dorada mediante una aproximación proteómica. Para alcanzar este objetivo, se han analizado los cambios en el patrón de expresión de las proteínas del hígado de dorada tras una exposición crónica (21 días) a la concentración de sulfato de cobre habitualmente utilizada (0.3 g/L). La separación de las proteínas se ha realizado mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE), con tiras IPG de 24 cm, pH= 3-11 NL. Los mapas de proteínas se han analizado mediante el software DeCyder 5.0. Se han encontrado cambios de expresión debido al tratamiento ($p \leq 0,01$) en 6 proteínas, 5 las cuales incrementan su abundancia y 1 disminuye respecto al control. Las proteínas que han presentado una expresión diferencial respecto al control, aún en estudio, se identificarán por espectrometría de masas.

Agradecimientos: Este estudio se ha realizado en servicio de Proteómica del SCSIE de la Universitat de València. Se agradece el apoyo técnico de Oreto Antúnez.