



Red Valenciana de Genómica y Proteómica

"1ª Jornada Conjunta GenProt"

Reunió Conjunta de Genòmica i Proteòmica de la Xarxa valenciana i la Xarxa catalana, i de la Secció de la SCB

*7-8 març 2008, Hotel Peñíscola Plaza Suites, Peníscola (Castelló),
(Auditori de l'Hotel, c/ Avda. Papa Luna 156, Peníscola)*

Sponsored by Xarxa de Referència en Biotecnologia(XeRBa, Generalitat de Catalunya)& Durviz SLU, BioRad & Roche



"1^a Jornada Conjunta GenProt "

7-8 març 2008 , Hotel Peñíscola Plaza Suites (Auditori)
c/ Avda. Papa Luna 156, Peníscola (Castelló)

Sponsored by Xarxa de Referència en Biotecnologia (XeRBa, Generalitat de Catalunya),
Durviz , Biorad & Roche

With the support of Sociedad Española de Bioquímica y Biol. Mol. (SEBBM)
and Sociedad Española de Proteómica (SeProt)

Friday, 7 March

14.30-15.45 **Reception at Hotel Peñíscola Plaza.** Meeting points at the Auditorium and Gales Bar lobby (the latter to hold posters).

16.00- 16.10 **Presentation of the meeting** (at the Auditorium). *F. Xavier Avilés & José. E. Pérez, Coordinators of the Networks.* Depts. de Bioquímica Biol. Mol. UAB & UV.

Session I. "Nowadays initiatives on Genomics & Proteomics". (Chairs: Vicente Conejero and Blanca Sansegundo).

16.20- 17.00 **Microbial molecular detection systems for pathogen discovery and surveillance.** *Gustavo Palacios.* Center for Infection and Immunity, Mailman School of Public Health, Columbia University (US) (sponsored by Roche).

17.05-17.45 **Development of tools for the analysis of the genome of *Cucurbitaceae*.** *Pere Puigdomènech.* Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC.

17.50-18.20. Coffee-break (sponsored by Durviz) and visit to posters

18.25-19.05 **Systemic protease degradomics by targeted gel-free proteomics.** *Kris Gevaert,* Department of Medical Protein Research, VIB, Ghent (Belgium).

19.10- 19.50 **Bioquímica y proteómica vegetal y agrícola.** *Jesús Jorrín.* Departamento de Bioquímica y Biol. Mol. Universidad de Córdoba (sponsored by Biorad).

20.15-21.40 Dinner

22.00- 23.00 **Posters & "beer" session.** Posters visit & beers at Gales bar & lobby

23.00- 00.30 **Music bar and dancing, at the hotel right-hand lobby.**

Saturday, 8 March. Session II. Functional genomics and systems biology. (Chairs: Enrique Herrero and Manuel Talón).

- 08.30- 09.00 **Utilització de la genòmica i de la variabilitat natural per a la millora de la tomata.** *Antonio Granell.* IBMCP-CSIV, Valencia.
- 09.00- 09.20 **Anàlisi de la resposta e *Saccharomyces cerevisiae* a estrés oxidatiu mitjançant GRO (Genomic Run-On): paper de l'estabilitat dels mRNAs.** *Laia Castells.* Dept. Ciències, Mèdiques bàsiques. Universitat de Lleida.
- 09.20- 09.40 **Análisis genómico del proceso de abscisión en los cítricos.** *Francisco Tadeo.* Centro de Genómica. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Montcada.
- 09:40-10.00 **Análisis transcripcional de la respuesta en raíces de diferentes especies de cítricos a la infección con *Phytophthora citrophthora*.** *M^a Carmen Marqués.* IBMCP-CSIV, Valencia

10.00-10.25. Coffee-break (sponsored by Durviz) and visit to posters

Session III. Proteomics (Chairs: Juan J. Calvete and Teresa Padró)

- 10.30-10.50 **Análisis proteómico de la simbiosis micorrícica en plantas de arroz.** *Lidia Campos,* Consorcio CSIC-IRTA Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Instituto de Biología Molecular de Barcelona-CSIC.
- 10.50- 11.10 **Low-density lipoproteins induce Heat Shock Protein 27 dephosphorylation in vascular smooth muscle cells.** *Maisa García Arguinzonis.* Institut de Ciències Cardiovasculars, CSIC-Hospital de Sant Pau, Barcelona.
- 11.10- 11.30 **Proteomic analysis of *Mycoplasma penetrans* membrane.** *Mario Ferrer-Navarro,* Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), UAB, Bellaterra (Barcelona).

Session IV. Comparative genomics and bioinformatics (Chairs: Antoni Romeu and Toni Gabaldón)

- 11.35-12.05 **SOPE, l'inici d'una relació endosimbiont obligada.** *Rosario Gil,* Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València.
- 12.05-12.25 **The tree versus the forest.** *Marina Marcet-Houben,* Centro de Investigación Príncipe Felipe.
- 12.25-12.45 **Gens solapats en genomes procariotes.** *Albert Pallejà.* Dept. Bioquímica i de Biotecnologia, Fac. Química, Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona.

End of the meeting. Poster retrieval.

13.00-14.30. Farewell lunch

Session I. "Nowadays initiatives on Genomics & Proteomics".

Microbial molecular detection systems for pathogen discovery and surveillance.

Gustavo Palacios.

Center for Infection and Immunity, Mailman School of Public Health, Columbia University (USA)

Molecular technologies are transforming diagnostic microbiology. The basic methods (PCR, real time PCR, multiplex PCR) present advantages regarding speed, sensitivity, low cost and potential to succeed in instances where there is no culture system or risk requires biocontainment. When this methods do not succeed, a second line of molecular techniques are also replacing classical methods for surveillance and discovery efforts. This second battery is based on the knowledge of sequences of known agents for detection of unknown, uncommon or unexpected pathogens (cPCR, microarrays). These efforts fail where agents are truly novel or sufficiently distant in sequence to related agents to confound hybridization. In those cases, as a final molecular tool, metagenomic pyrosequencing appears as a new alternative to allow rapid characterization of all nucleic acid in a sample. We will describe the application of this staged strategy for pathogen discovery and virus surveillance and discuss its advantages and pitfalls.

Development of tools for the analysis of the genome of *Cucurbitaceae*.

Víctor González, Jordi Garcia, Pere Arús i Pere Puigdomènech.

Laboratori de Genètica Molecular CSIC-IRTA. Barcelona.

Among horticultural species, *Cucurbitaceae* are second only after *Solanaceae* in terms of human consumption and economic value. Our group decided some years ago to start a project on the genomics of melon (*Cucumis melo*) as an example among these species for its special interest in the Mediterranean area. It is a species that has a relatively small genome (around 450 Mb), is a diploid species and it is possible to construct in it populations for genetic analysis. It can be identified that breeding in this species has two main goals: disease resistance and quality of the fruits. For this reason a number of tools have been developed in order to advance in the knowledge of the molecular basis of these characters and to provide with molecular markers that can be used for the breeders. The tools include ESTs, a genetic map saturated with molecular markers that has been progressively transformed in markers related to specific biological functions, a population of near-inbred lines and a population of mutated plants that can be used for tilling. A number of results have been obtained such as the cloning of the gene coding for resistance to a virus (necrotic spot virus) by map-based cloning. One of our next goals is the sequencing of the melon genome. A BAC library has been constructed and a physical map has been started. A pilot experiment of sequencing using pirosequencing has been carried out with positive results. We hope to start the whole project in the coming weeks.

Systemic protease degradomics by targeted gel-free proteomics

Kris Gevaert, Petra Van Damme, Francis Impens, Veerle Vandenbussche, Kim Plasman, Kenny Helsens, Niklaas Colaert, An Staes, Evy Timmerman, Pieter-Jan De Bock, Hans Demol, Marc Goethals, Jozef Van Damme, Joël Vandekerckhove

Department of Medical Protein Research, VIB, Ghent (Belgium).

Restricted and selected processing of proteins by proteases controls a large number of physiological processes. Not surprisingly, imbalances between proteases, their inhibitors and substrates are associated with pathologies. The human genome encodes more than 500 proteases of which the overall majority is hitherto uncharacterized. Mapping the substrate repertoire of proteases is in fact a daunting task since until recently no high-throughput techniques directly analyzing natural substrates (proteins) in their natural environment (the proteome) were available.

Our lab developed the COFRADIC portfolio of gel-free proteome analytical techniques that, amongst others, isolate N-terminal peptides from a whole proteome digest. When used in a differential setup (e.g. following metabolic labeling of cells with stable isotopes), COFRADIC points to neo-N-termini that directly mark protease substrates and their processed sites.

The following aspects of COFRADIC protease degradomics will be discussed: continuous technical improvements (Staes and Van Damme *et al.*, Proteomics, in press), bioinformatics tools for qualitative reporting and (public) dissemination of substrate lists, protease kinetics and on-bead assays for protease activity profiling (Stubbe *et al.*, Adv. Funct. Mater., in press) etc ... Selected examples of recent protease degradome studies include detailed profiling of *in vivo* granzyme-mediated cell death of K-562 cells by natural killer cells, hints to calpain activity in taxol-induced A549 cell death and a substrates hunt for proteins involved in anthracycline-induced apoptosis of leukemia cells (Gausdal *et al.* (2008), Blood Jan 8 [Epub ahead of print]).

Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola

Jesús V. Jorrín Novo

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba (bf1jonoj@uco.es)

El título de la presentación, Bioquímica y proteómica Vegetal y Agrícola, se corresponde con la denominación de nuestro grupo de investigación, de acuerdo al Plan Andaluz de Investigación (PAI AGR-164). Desde su creación, por el prof. Manuel Tena Aldave, el grupo ha tenido como objetivo el estudio de las respuestas adaptativas y las de resistencia/tolerancia a estreses bióticos (patógenos y plantas parásitas) y abióticos (sequía, metales pesados, impedancia mecánica), utilizando como sistemas experimentales plantas modelo (*Arabidopsis*, *Medicago truncatula*), especies de interés agrícola (girasol, leguminosas, maíz) o forestal (*Quercus ilex*, *Pinus radiata*). Mediante técnicas de bioquímica clásica se ha investigado la inducción de determinados metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos (caso de isoflavonoides en leguminosas y cumarinas en girasol), proteínas PR (glucanasas, quitinasas), y sistemas destoxicantes de EROs (químicos y enzimáticos); dichos estudios se han complementado con técnicas cito e histoquímicas. En el año 2003 iniciamos una línea de investigación sobre proteómica vegetal, siendo la aproximación más utilizada, hoy en día, en nuestro laboratorio, aunque complementada con técnicas de bioquímica clásica, transcriptómica y genética inversa.

La proteómica, considerada como disciplina científica o aproximación metodológica, tiene como objetivo el estudio del proteoma de los diferentes seres vivos, entendido como el conjunto de todas y cada una de las formas proteicas presentes en una unidad biológica (fracción subcelular, célula, tejido, órgano, organismo) en un tiempo (estadio de diferenciación y desarrollo) y bajo condiciones ambientales determinadas. Esta definición da idea, y a diferencia del genoma, del dinamismo que caracteriza al proteoma. La proteómica como metodología surge tras los grandes proyectos de secuenciación de genomas y la búsqueda de función para el gran porcentaje de genes cuya función se desconoce y su explosión se debe al desarrollo de potentes técnicas de separación de proteínas (electroforesis y cromatografía líquida), de espectrometría de masas y de software y programas informáticos de búsqueda en bases de datos y manejo de datos.

La proteómica, constituye, hoy en día, un área de investigación prioritaria en cualquier proyecto biológico, y la investigación vegetal no es una excepción a dicha regla. El enorme potencial de la proteómica y su aplicación al estudio de la biología vegetal y a aspectos prácticos está lejos de ser explotada, aunque hay suficientes ejemplos en la literatura que la validan. Con ejemplos de tomados de la literatura y los propios de nuestro grupo ilustraremos las posibilidades, retos y limitaciones de la técnica, derivados de la enorme complejidad del proteoma, la diversidad, comparada con los ácidos nucleicos, en la química, estructura y función de las proteínas, y de la falta de técnicas, que como la PCR, permita la amplificación de señales. Intentaremos dar una visión integrada y multidisciplinar de la biología de las especies vegetales, con énfasis en las contribuciones de la proteómica al estudio de procesos de diferenciación y desarrollo, respuesta a estreses, modificaciones postraduccionales, interactómica, y a aspectos prácticos como el genotipado, trazabilidad alimentaria, equivalencia sustancial en cultivos transgénicos e identificación de alérgenos. Parafraseando a B. Marte, editoria señor de Nature (2003): "*we are just beginning to appreciate the power and limitations of the genomics revolution, yet hard on its heels proteomics promises and even more radical transformation of biological research*"

Session II. Functional genomics and systems biology.

Utilització de la Genòmica i de la Variabilitat Natural per a la Millora de la Tomata

Granell, L. del Castillo , A. Fernández, L. Hueso, A. Medina, A. Micó, S. Mirabel, D. Orzaez, S. Osorio, S. Torre, .R. Fernandez

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Ciudad Politécnica de La Innovación. Ingeniero Fausto Elio s/n 46022 Valencia. agranell@ibmcp.upv.es

Presentarem part de les eines genòmiques desenvolupades en tomata, i la seua utilització en l'anàlisi de la variabilitat genètica representada en forma de lines RILs o QTL-NILs, per tal d'identificar gens o regions gèniques responsables dels caràcters de qualitat de fruit en tomata. Com a fita i pedra angular, la comunitat de solanàcies està a meitat camí d'obtenir la secuencia genòmica de les regions riques en gens de la tomata. En aquest project hi participem, seqüenciant el cromosoma 9. Presentarem l'estratègia, eines i l'avanç realitzat.

Anàlisi de la resposta de *Saccharomyces cerevisiae* a estrès oxidatiu mitjançant GRO (Genomic Run-On): paper de l'estabilitat dels mRNAs

Laia Castells-Roca¹, María Micaela Molina-Navarro¹, Gemma Bellí¹, José García-Martínez³, Julia Marín-Navarro², Joaquín Moreno², José E. Pérez-Ortín², Enrique Herrero¹.

¹*Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques i IRBLleida, Universitat de Lleida,* ²*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y* ³*Servicio de Chips de DNA-S.C.S.I.E, Universitat de València.*

En situacions d'estrès, les cèl·lules han desenvolupat estratègies ràpides per tal de sobreviure, que inclouen canvis en els seus patrons d'expressió gènica. En aquest treball s'analitza (mitjançant la tècnica de *Genomic Run-On*) la resposta de *Saccharomyces cerevisiae* a estrès oxidatiu, determinant en paral·lel els nivells de mRNA i les taxes de transcripció (TR) pel seu genoma complet i, gràcies a l'adaptació d'un algoritme matemàtic a situacions dinàmiques com l'estrès, es calculen les taxes teòriques de degradació dels mRNAs a partir de les dades experimentals.

Els gens de *S. cerevisiae* s'agrupen en 25 *clusters* segons els seus perfils de TR i de nivells de mRNA. La majoria dels gens responen a l'estrès amb canvis en un o els dos paràmetres alhora, però mostren diferents evolucions en els seus patrons respectius, fet que fa preveure canvis en l'estabilitat dels mRNAs durant l'estrès. Per una banda, els mRNAs en els quals es prediu una desestabilització presenten un enriquiment de gens que codifiquen proteïnes ribosomals i enzims processadors de rRNA; per altra banda, el nombre de gens pels quals es prediu una estabilització dels seus mRNAs és menor i inclouen diversos mRNAs que codifiquen per a proteïnes del plegament o del proteosoma. El nostre estudi ha confirmat les prediccions matemàtiques per a diversos gens que pertanyen a diferents *clusters*, calculant experimentalment la taxa de degradació del seu mRNA utilitzant el promotor *tetO* regulable per doxiciclina.

Aquest treball mostra que la resposta a estrès oxidatiu en cèl·lules de llevat ve condicionada no només per la TR, sinó també per la dinàmica de la taxa de degradació dels mRNAs i, en particular, aquest paràmetre pot ser important per explicar una repressió de la síntesi de proteïnes després d'aquest estrès.

ANÁLISIS GENÓMICO DEL PROCESO DE ABSCISIÓN EN LOS CÍTRICOS

Francisco R. Tadeo, Javier Agustí, Paz Merelo, Javier Terol, Ana Conesa, Fernando Andrés, Manuel Cercós, Manuel Talón

*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias – Centro de Genómica
Carretera Moncada-Náquera Km 4,5
46113 Moncada (Valencia)*

La rentabilidad del cultivo de los cítricos, como la de todos los frutales, está basada en dos pilares básicos: la calidad de la fruta y la producción final. La producción representa, a su vez, el producto de dos factores: el tamaño del fruto (un factor muy ligado también a la calidad) y el número de frutos. El desprendimiento o la abscisión de flores y de ovarios en crecimiento durante la época de caída fisiológica y la abscisión de frutos maduros antes de la recolección, son procesos que condicionan la cosecha final de los cítricos. Además, la aportación de fotoasimilados al fruto en crecimiento por parte de las hojas maduras es vital para el cuajado del fruto y, por tanto, el mantenimiento de un volumen de copa adecuado es otro factor muy importante para que la producción final de fruta sea adecuada. El conocimiento a nivel fisiológico y molecular de los procesos metabólicos implicados en el desprendimiento o abscisión de hojas y frutos es muy importante para el mantenimiento de la Citricultura y para hacer frente a los cambios sociales y económicos del mercado mundial de cítricos. Nuestros objetivos principales son identificar y caracterizar genes y rutas metabólicas relacionadas con la abscisión de estructuras vegetativas y reproductivas en los cítricos con el fin de regular la producción y, de esta forma, asegurar la rentabilidad de nuestra industria citrícola. 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). Mediante la generación de genotecas de cDNA a partir de ZAs activadas tanto por el desarrollo como por fitohormonas (etileno) o condiciones medioambientales adversas (estrés hídrico), la puesta a punto de un método de microdissección asistida por láser para recolectar células puras de las ZAs y el uso de las micromatrices de cDNA generadas dentro del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos estamos avanzando en el conocimiento del proceso de abscisión en los cítricos.

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA RESPUESTA EN RAÍCES DE DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS A LA INFECCIÓN CON *Phytophthora citrophthora*.

Marqués, M.C.¹, Abizanda, L.¹, Díez-Díaz, M.¹, Gadea, J.¹, Gisbert, A.¹, Hinarejos, C.², López-Gresa, M.P.¹, Mira, J.L.², Rodrigo, I.¹, Tuset, J.J.² y Conejero, V.¹

1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Ciudad Politécnica de la Innovación. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia (Valencia), ESPAÑA. 2) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Náquera, km 4.5. 46113 Moncada (Valencia). ESPAÑA

Los organismos fitopatógenos poseen sofisticados sistemas físicos, enzimáticos y moleculares que facilitan su entrada y dispersión en los huéspedes a los que infectan. Las plantas, por su parte, a lo largo de la coevolución con dichos microorganismos han desarrollado sistemas defensivos que les confieren la posibilidad de impedir la incursión del patógeno o, en su caso, frenar su avance. Algunos de estos sistemas son preexistentes y constituyen barreras físicas que impiden la penetración del patógeno (cutícula, pared celular, etc.) o bien, la presencia de metabolitos con propiedades antimicrobianas (flavonoides, fitoalexinas, glucosinolatos, etc.). Otros, sin embargo, se activan como consecuencia del reconocimiento del patógeno y contribuyen al establecimiento de una compleja respuesta defensiva que, en última instancia, conduce a la contención del patógeno y a la protección frente a nuevas infecciones. Esta defensa inducible se caracteriza por la activación transcripcional de numerosos genes implicados en procesos de detoxificación, muerte celular, biosíntesis de enzimas con propiedades antimicrobianas (glucanasas, quitinasas, proteasas, y otras proteínas relacionadas con la defensa) así como de moléculas señalizadoras de la infección (ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico, etc.), entre otros.

El hongo oomiceto *Phytophthora citrophthora* es el agente causal de una enfermedad con gran repercusión en España conocida como “gomosis” del tronco y que produce también podredumbre de raíces, afectando no solamente a la cantidad y calidad de la cosecha sino también a la viabilidad del árbol. Con el fin de desentrañar cuáles son los mecanismos moleculares que determinan la resistencia a dicho hongo fitopatógeno, hemos emprendido el análisis transcripcional de la respuesta a la infección que presentan diferentes especies de cítricos, seleccionadas éstas en base a diferencias en su resistencia/susceptibilidad frente a dicho patógeno.

Para ello, se infectaron raíces de *Citrus aurantifolia* (lima mejicana) especie muy resistente (asintomática), *Citrus aurantium* (naranja amarga), especie medianamente resistente y *Citrus sinensis* (naranja dulce), altamente susceptible, con esporas del hongo *P. citrophthora*. Muestras tomadas a las 48 horas después de la infección se utilizaron para hibridar un microarray de cDNA desarrollado por el Proyecto de Genómica de Cítricos en el que están representados 12000 genes de cítricos.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión génica en lima mejicana no parece experimentar cambios significativos, sugiriendo que su resistencia es de tipo constitutivo. En cambio, en naranja amarga, como respuesta a la infección, se inducen y reprimen un elevado número de genes, lo que indica que la resistencia de dicha especie, al menos en parte, puede ser de naturaleza inducible. Por último, es interesante resaltar que, en naranja dulce, predomina la represión génica, lo cual podría explicar la susceptibilidad de dicha especie.

En el presente trabajo se muestra una relación más detallada de los resultados obtenidos, así como una discusión de los mismos.

Session III. Proteomics

Análisis proteómico de la simbiosis micorrícica en plantas de arroz

Lidia Campos-Soriano, Sami Irar y Blanca San Segundo

Consorcio CSIC-IRTA de Genética Molecular Vegetal, Dpto de Genética Molecular, Inst. Biología Molecular de Barcelona-CSIC. Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, España.

Introducción

Las micorrizas, hongos que establecen asociaciones simbióticas con las plantas, incrementan y facilitan la absorción de nutrientes del suelo. El mutualismo supone por tanto una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, tanto el hongo como la planta: el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes minerales y agua, extraídos del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos elaborados a través de la fotosíntesis. (Smith y Read, 1997). A diferencia de los hongos patógenos biótrofos, las micorrizas presentan un amplio rango de huésped. Se estima que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo. El establecimiento de la asociación simbiótica se produce a través de una serie de etapas: i) fase presimbiótica; ii) interacción con la planta y entrada del hongo en el tejido radicular; iii) proliferación; iv) colonización de la raíz por el hongo; y iv) invaginación celular y transferencia de nutrientes.

Se desconoce cuales son los mecanismos por los cuales durante el establecimiento del hongo micorrícico en el tejido vegetal, éste escapa o anula los mecanismos de defensa de la planta (mecanismos de defensa que se desarrollan en la planta en su interacción con hongos patógenos). Los estudios desarrollados hasta la fecha en interacciones planta-micorriza han sido realizados principalmente en especies dicotiledóneas (en particular en *Medicago truncatula*) (Journet et al. 2002). Sin embargo, *Arabidopsis*, planta modelo de dicotiledónicas, no es susceptible de colonización por micorrizas arbusculares. En monocotiledóneas, el arroz si que es huésped de micorrizas arbusculares. Estudios transcriptómicos de arroz micorrizado por el hongo *Glomus intraradices*, indican que existen mecanismos conservados en la respuesta de monodicotiledóneas y dicotiledóneas durante su interacción con micorrizas arbusculares. En este mismo estudio también se observó que existe un elevado grado de conservación en la respuesta de la planta de arroz a la colonización por el hongo simbiote y por hongos patógenos (Güimil et al. 2005).

Resultados

En el laboratorio se ha iniciado una línea de investigación para caracterizar los cambios en el proteoma de la raíz de arroz asociados al establecimiento de la micorriza arbuscular *Glomus intraradices*. El análisis mediante electroforesis bidimensional de alta resolución de extractos de proteínas de raíces de arroz permite resolver aproximadamente 1.250 proteínas. La comparación de los patrones proteicos de raíces micorrizadas vs raíces no micorrizadas permitió identificar un total de 91 proteínas que son desreguladas durante el establecimiento de la simbiosis. Aquellas proteínas que superaban el test t fueron seleccionadas para su posterior caracterización mediante espectrometría de masas. Se presentarán los avances observados en el análisis de dichas proteínas. En definitiva, los resultados obtenidos ilustran la utilidad de las aproximaciones proteómicas para el estudio de la interacción planta-micorriza arbuscular en arroz, especie que es ya utilizada como modelo en estudios de genómica de cereales y que además presenta un evidente interés agronómico.

Referencias

- Güimil, S., Chang, H.S., Zhu, T., Sesma, A., et al.. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102(22):8066-70.
- Journet, E.P., van Tuinen, D., Gouzy, J., Crespeau, H., et al. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30(24):5579-92.
- Smith, S.E., Read, D.J.. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, London. 1997. 605 pp.

Low-density lipoproteins induce Heat Shock Protein 27 dephosphorylation in vascular smooth muscle cells

Maísa García Arguinzonis, Teresa Padró, Vicenta Llorente-Cortes and Lina Badimon

Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), CSIC-Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, Barcelona.

High concentration of circulating LDL is a major atherosclerotic risk factor. Vessel infiltrated LDL are retained and aggregated (aLDL) by binding to intimal proteoglycans. LDL-mediated effects on vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotype and function during plaque remodelling and vascular repair are not fully understood.

We have investigated whether exposition of VSMC to LDL induces changes on the proteomic profile of the heat shock protein family (HSP), molecular chaperones with ability to protect proteins from damage. We demonstrate that LDL modifies the proteomic signature of HSP27, a small HSP with cytoprotective roles including chaperone activity, apoptosis, signalling regulation, and oxidative stress modulation.

Western blot analysis evidenced a significant HSP27 dephosphorylation after exposition of cells to native LDL (nLDL) and aLDL for 24 hours ($p < 0.05$). Dephosphorylation was consequence of PPA2 activation rather than p38 MAPK-pathway inhibition. Immunohistochemistry studies showed that phosphorylated HSP27 was rarely found in lipid rich areas of atherosclerotic plaque in human coronary arteries. Moreover, nLDL and aLDL induce relocalization of unphosphorylated HSP27 to the tip of actin stress fibres and focal adhesion structures in VSMC.

In summary, our results suggest that LDL modulates HSP27 phosphorylation and its subcellular localization in VSMC.

Proteomic analysis of *Mycoplasma penetrans* membrane

Mario Ferrer-Navarro^{*}, Raquel Planell^{*}, Sílvia Bronsoms^{*}, Núria Colomé[#], Francesc Canals[#], Francesc X. Avilés^{*}, Enrique Querol^{*}.

^{*} Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. tf. 34-93-5811331, Em : Mario.ferrer@bioinf.uab.es

[#] Institut de recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain

Mycoplasmas are the smallest and simplest self-replicating bacteria. Mycoplasmas are bacteria with no cell wall and have the minimum range of genome sizes necessary for selfreplication. Mycoplasmal infections are most frequently associated with disease in the urogenital or respiratory tracts and, in most cases, mycoplasmas infect the host persistently.

These parasites display antigenic diversity as a mechanism for evasion of host immune response. *Mycoplasma penetrans* was first isolated from urine samples from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients, and also from a patient with a case of primary antiphospholipid syndrome. It has been demonstrated that some lipoproteins from *Mycoplasma penetrans* enhance HIV replication.

Because of the lack of information of *Mycoplasma penetrans* membrane two techniques have been used to analyze the membrane of this mycoplasma. First we have obtained a membrane protein enriched sample using the Triton X-114 two-phase separation protocol and then we have separated them by 2DE. In other approach we have shaved the surface of the cells using different proteases treatments and the obtained peptides were analyzed by LC-MS giving us information about which proteins are on the surface of this mycoplasma.

Related References

- Ferrer-Navarro M., Gomez A., Yanes O., Planell T., Aviles F.X., Piñol J., Perez-Pons J.A. & Querol E. "Proteome of the bacterium *Mycoplasma penetrans*", 2006, J Proteome Res. 5, 688-694.
- Pich OQ, Burgos R., Ferrer-Navarro M., Querol E. & Piñol J. "*Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytheadherence", 2006, Mol Microbiol. 60, 1509-1519.

Session IV. Comparative genomics and bioinformatics

SOPE, l'inici d'una relació endosimbiòtica obligada

Rosario Gil¹, María José Gosalbes¹, Eugeni Belda¹, Luis Dejaye^{1, 2}, Abdelaziz Heddi³, Francisco J. Silva¹, Amparo Latorre¹ i Andrés Moya¹.

¹*Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva and Departament de Genètica, Universitat de València, Apartado Postal 22085, 46071 València, Spain.*

²*Facultad de Ciencias, UNAM, Apdo. Postal 70-407, Cd. Universitaria, 04510 México, D. F., México.*

³*Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions, UMR INRA/INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex, France.*

Les simbiosis mutualistes intracel·lulars (endosimbiosis) són molt freqüents entre els insectes, permetent-los mantenir-se en base a dietes desequilibrades, pobres en nutrients essencials que els són subministrats pels seus bacteris endosimbionts. La transició des d'una forma de vida lliure a un estil de vida intracel·lular obligat provoca una cascada de canvis que modelen l'estructura i contingut dels genomes d'aquests bacteris.

Els genomes de diversos α -proteobacteris que mantenen aquest tipus de relació amb diferents insectes han estat publicats en temps recents, cosa que permet realitzar comparacions entre ells i amb bacteris de vida lliure. La seqüenciació de genomes de bacteris amb relacions recents i antigues amb els seus hostatgers, ens ajuda a entendre quins canvis han tingut lloc en les diferents etapes del procés d'integració simbiòtica i els processos que els han provocat.

Actualment, al nostre grup estem treballant en el genoma de SOPE (*Sitophilus oryzae* primary endosymbiont), l'endosimbiont primari del corcò de l'arròs. Hi ha diverses evidències de que la relació de SOPE amb el seu hostatger és evolutivament molt recent, en comparació amb altres endosimbionts d'insectes analitzats fins ara. A més, SOPE està molt pròxim filogenèticament a *Sodalis glossinidius* (simbiont secundari de la mosca tse-tse), que encara pot mantenir-se en cultiu de forma independent del seu hostatger, i del que es disposa del genoma complet seqüenciat. Per tant, la caracterització del contingut gènic del genoma de SOPE i la seua comparació amb el genoma de *S. glossinidius*, ens podrà ajudar a comprendre com ha tingut lloc el procés evolutiu durant les etapes inicials de la relació intracel·lular mutualista obligada. Entre les característiques a analitzar s'inclouen el contingut gènic i la seua classificació funcional, l'existència de famílies gèniques conservades, la presència de possibles factors implicats en la relació hostatger-endosimbiont, l'acumulació de mutacions i la rellevància del DNA repetitiu, en el qual la presència d'elements d'inserció sembla ser determinant en el procés de degradació genòmica ja iniciat.

The tree versus the forest

Marina Marcet-Houben and Toni Gabaldón.

Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia

The advent of the genome era has brought about the possibility to use the information contained in a growing number of fully-sequenced genomes. As a result, new approaches to perform evolutionary analysis have been developed. One such examples is how we can address the classical problem of establishing the evolutionary relationships of a group of species, also known as the “tree of life” problem. Until very recently, phylogenetic trees were built from the information contained in a single gene family. Nowadays, however, multiple methods have been developed in order to approach the problem from a genomic standpoint, combining the information from multiple gene families or using different features from the genomes themselves in order to build more accurate phylogenies. It has long been observed that phylogenetic trees built from different genes may provide conflicting topologies. Multiple gene approaches average out this single-gene discrepancies to provide a single topology that represents the strongest phylogenetic signals from the data. Although widely used, these trees have been criticized for not representing the existing topological diversity within a genome.

In order to address this issue and quantify the level of discrepancy between multiple-gene phylogenetic trees and the actual topological variation within a genome. We compared the tree of life for the fungal kingdom, as reconstructed from a typical multi-gene concatenation approach, with the complete collection of single-gene phylogenetic trees for the *Saccharomyces cerevisiae* genome.

We first built a fungal tree of life including 61 species with fully-sequenced genomes by concatenating 28 proteins that were widespread and which did not contain duplications. This tree, represents the largest fungal tree of life reported so far and, when compared to four other published fungal trees of life showed a high level of congruency, with the exception of a few nodes that proved to be quite variable in all trees. To compare this topology with the real topological diversity that can be found in a given genome we built the phylome of *Saccharomyces cerevisiae*, that is, the collection of all phylogenetic trees from each gene of the genome. This phylome is built following a phylogenetic pipeline that starts by comparing each yeast protein, called seed protein, to all proteins encoded in the other 61 fungal genomes plus the genomes of *Homo sapiens* and *Arabidopsis thaliana* which would serve as outgroups. Sets of homologous proteins are aligned, trimmed and used to reconstruct a phylogenetic tree by a Maximum Likelihood approach. These phylogenetic trees were all compared against the tree of life we obtained. This comparison proved that only 5% of the almost 5700 trees follow exactly the topology derived from the tree of life. Also, those trees contained in general very few species (98% of the congruent trees have less than ten species). To assess whether the low taxonomic sampling of some fungal groups was causing this low level of congruency, we built a new yeast phylome containing only the well-sampled Saccharomycotina species, plus three outgroups. Again, only 6% of these smaller phylogenetic trees were fully congruent with the tree of life and, moreover, they often showed variations in topology respect the corresponding larger tree.

This large topological diversity found in single gene trees explains the difficulty in building a reliable tree of life as each gene seemingly supports a different topology. It also warns of the dangers of using strict reconciliation with species trees to infer orthology relationships. Whether of biological or methodological grounds, we need novel ways to cope with this diversity and assure that our evolutionary inference is free from biases.

Overlapping Genes Among Prokaryotic Genomes

Albert Pallejà¹, Pere Puigbó¹, Santiago Garcia-Vallvé¹, Antoni Romeu¹, Eoghan D. Harrington², Peer Bork²

1: Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Campus Sescelades. 43007 Tarragona.

2: European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany.

Prokaryotic chromosomes contain protein-coding genes, structural RNAs and spacers between genes which are typically thought to contain regulatory signals. Prokaryotic genome sizes evolve maintaining the biochemical, physiological and organism complexity of each species. A consistent feature of prokaryotic genomes is the presence of overlapping genes.

Among the fully sequenced prokaryotic genomes, thousand of overlapping pairs of genes have been predicted in all three transcription directional classes: co-directional, convergent or divergent. Most typically, prokaryotic adjacent gene pairs overlap 1 or 4 base pairs. Large gene overlaps have also been described. While there is plenty of evidence that small gene overlaps of several nucleotides enhance coordinated transcription of functionally related genes, it is not known whether long overlaps are the product of special functional constraints or simply of erroneous annotation.

Here we analyse long overlaps between well-characterized genes

(This project has been supported by the Ministerio de Educació y Ciencia. Spain. Project AGL2007-65678/ALI).

Pósteres

Póster nº 1

Una aproximación genómica al estudio del modo de acción de péptidos antimicrobianos sobre *Saccharomyces cerevisiae*

López-García, B., 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; jmarcos@iata.csic.es

Nuestro grupo trabaja en la utilización de la levadura *S. cerevisiae* como modelo unicelular para el estudio del modo de acción de pequeños péptidos antifúngicos, desde una perspectiva de genómica funcional.

Se han analizado la sensibilidad de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, y los cambios en el transcriptoma de *S. cerevisiae* FY1679 por la exposición a concentraciones subinhibitorias del hexapéptido sintético PAF26 y del péptido citolítico natural Melitina. La hibridación de macromatrices que contienen secuencias de 6.021 ORF del genoma de *S. cerevisiae* (<http://scsie.uv.es/>) y el análisis de sus resultados nos han permitido identificar genes con expresión diferencial en cada una de las condiciones de estudio. Así, por la exposición a PAF26 cambian su expresión el 6,8% de 5.229 genes analizados (354), mientras que en el caso de Melitina son 7,4% de 5.173 (381). Sólo 64 de los genes cuya expresión cambia son comunes en ambos péptidos, observándose además cambios diferenciados 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 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) revela entre los genes inducidos con ambos péptidos una representación significativa de genes relacionados con la génesis y composición de pared celular, así como otras categorías relevantes. Cabe destacar la represión por tratamiento con PAF26, pero no por Melitina, de la expresión de genes relacionados con la unión a RNA y el procesamiento de pre-rRNA. Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real se han comprobado los cambios de expresión de 14 genes significativos de estas anotaciones. Se ha analizado la sensibilidad a distintos péptidos antimicrobianos de cepas de *S. cerevisiae* deletantes en 52 genes seleccionados (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>), 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.

An information entropy model for the phylogenesis of the 1918 influenza virus

Francisco Torrens and Gloria Castellano

Institut Universitari de Ciència Molecular, Universitat de València, Edifici d'Instituts de Paterna, P. O. Box 22085, 46071, and Instituto Universitario de Medio Ambiente y Ciencias Marinas, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, 46003, València, Spain

Lysozyme is an enzyme with 129 residues. The amino-acid compositions of certain avian lysozymes was determined. The amino-acid sequence of hen egg-white lysozyme was annotated. Certain discrepancies exist between this sequence and that reported in (at residues 40, 41, 42, 46, 48, 58, 65, 66, 92 and 93). Crystallographic analysis gave results for residues 40, 41, 42, 58, 59, 92 and 93 that are in agreement with the former. Discrepancies at residues 46, 48, 65 and 66 are a difference between Asp or Asn; from the electron density maps it could not be determined whether these residues are amide or free acid. The amino-acid sequences of duck, Japanese quail and turkey egg-white lysozymes were determined. Amino-acid sequences for human urine and milk lysozymes were determined. Comparative studies of sequences for lysozymes of different origins are interesting from the viewpoint of structure–function relationships (the Asp-101 of hen lysozyme, which is known to be implicated at the substrate binding site, is replaced by Gly in turkey lysozyme). The Trp-62 of hen lysozyme, which also plays an important role in substrate binding, is replaced by Tyr in human lysozyme. Differences between avian species sequences that are compared are expressed as percentage of different amino acids in lysozyme. The greater the differences, the farther in time must be separation between species. *Grouping level b* can be identified with *biological time*. Obtained *phylogenetic tree* is represented by scheme: $(1,...,5) \rightarrow (1,4,5)(2,3) \rightarrow (1,5)(2,3)(4) \rightarrow (1)(2,3)(4)(5) \rightarrow (1)(2)(3)(4)(5)$. The scheme is in agreement with data obtained in morphological studies. Optimality criterion SS associated with different proposals for phylogenetic trees allows *equipartition conjecture* to be validated or invalidated in phylogenesis. If, in the calculation of *entropy* associated with the phylogenetic tree, a species is systematically omitted, difference between entropy with and without this species can be considered as a measure of *species entropy*. Such contributions may be studied with equipartition conjecture. It is not within the scope of the simulation method to replace biological tests of drugs or field data in palaeontology, but such simulation methods can be useful to assert priorities in detailed experimental research. Available experimental and field data should be examined by different classification algorithms to reveal possible features of real biological significance. Scheme is in agreement with data obtained in morphological studies and with the method based on entropy production and the conjecture of equipartition of production of entropy. An arsenal of effective medicines and others in developing phase is available. Research in viral genomes expedites progress. In the search of the keys of the origin of 1918 virus hemagglutinin (HA), the gene sequences of HA subtype H1 of several strands of influenza virus were analyzed. Its phylogenetic tree was built. The samples of 1918 strand are inscribed in that family of influenza virus adapted to man. Distance between 1918 gene H1 and known avian family reflects that it was originated in a strand of avian influenza virus, although evolved in unidentified host before emerging in 1918.

NGO: Plataforma para la investigación en Genómica Nutricional mediante una Ontología Biomédica que integra datos de genotipo, ambiente y fenotipo

Antonio Fabregat¹, María Arregui¹, Elisabet Barrera¹,
Olga Portolés¹, Dolores Corella², Oscar Coltell¹

¹Grupo BioInfoGenómica, Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos, Universitat Jaume I. Castellón. ²Grupo EPIGEM, Universitat de València, Valencia.

Introducción. En los estudios de Genómica Nutricional que se realizan en la actualidad, se adquieren y generan enormes cantidades de datos de orígenes heterogéneos como por ejemplo: genotipos, factores ambientales (dieta y otros factores de estilo de vida) y fenotipos (distintos fenotipos intermedios y finales relacionados con las enfermedades cardiovasculares). Por tanto, es cada vez más importante disponer de modelos, soluciones y plataformas tecnológicas que ayuden en la adquisición, almacenamiento, tratamiento y presentación de la información relativa.

Objetivos. El objetivo principal es el diseño, desarrollo y validación de una Ontología biomédica, denominada NutriGenOntología (NGO), para la formalización e integración de datos genómicos, ambientales y fenotípicos para la investigación en Genómica Nutricional aplicados al estudio de las enfermedades cardiovasculares y fenotipos relacionados. En otras palabras, se trata de proporcionar, a los grupos epidemiológico-genómicos, modelos y soluciones computacionales concretas que les sirvan de soporte en el desarrollo de su investigación para adquirir y tratar la ingente cantidad de datos que se asocian con el tipo de estudios que llevan a cabo.

Métodos. Para el desarrollo de las ontologías se ha utilizado la herramienta de modelado de ontologías Protégé (<http://protege.stanford.edu>). Asimismo, al quedar instalada en un servidor con soporte para PHP, las ontologías se manejan con RAP, RDF API para PHP incluido en pOWL (<http://powl.sourceforge.net>). Además de PHP, se han integrado tecnologías tales como JavaScript, XHTML, Xajax, Prototype, Scriptaculous, servicios Web SOAP y las que proporciona el espacio Web <http://www.ngo.uji.es>, cedido al grupo por el Servei d'Informàtica de la Universitat Jaume I, y donde se encuentra instalado el sistema.

Resultados. Los resultados del trabajo se pueden describir como la definición, diseño e implementación de la NGO como proyecto científico y técnico global. Además, dicho proyecto se ha realizado componiendo tres subproyectos de naturaleza distinta: el modelado e implementación de una Ontología para el alineamiento de diferentes tablas de composición de alimentos (TCA), como base para medir la dieta, tanto para los alimentos como para los nutrientes de los mismos; el modelado e implementación otra Ontología para modelar la interacción Gen-Ambiente; y finalmente el desarrollo de un subsistema para la estimación del riesgo cardiovascular según las ecuaciones de Framingham calibradas.

Conclusiones. Se ha construido una ontología biomédica que permite la formalización e integración de datos genómicos, ambientales y fenotípicos en el ámbito de la investigación en Genómica Nutricional aplicada al estudio de las enfermedades cardiovasculares y fenotipos relacionados. La ontología puede manejar varias tablas de composición de alimentos, coeficientes de estudios de asociación correspondientes a efectos genéticos e interacciones ambientales con los fenotipos intermedios y datos de participantes en estudios para predecir sus fenotipos intermedios y determinar su riesgo cardiovascular.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos P11A2005-07 (UJI-BANCAJA), GEN2006-26420-E_PIA42006-7 (Ministerio de Educación y Ciencia), COMBIOMED (RD07/0067/0006, ISCIII-FIS, Ministerio de Sanidad) y CIBER "Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición" (ISCIII-FIS, Ministerio de Sanidad).

Efecto hipolipemiante de los fitoesteroles de la dieta y su modulación por genes candidatos

María Arregui¹, Antonio Fabregat¹, Olga Portolés¹, Elisabet Barrera¹, Dolores Corella², Oscar Coltell¹

¹Grupo BioInfoGenómica, Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos, Universitat Jaume I, Castellón. ²Grupo EPIGEM, Universitat de València, Valencia.

Introducción. El interés de los fitoesteroles (FE) como protectores del riesgo cardiovascular se debe a su acción hipocolesteromiante. Se ha estimado que un consumo de entre 1,5-3 g/día disminuye significativamente el colesterol plasmático así como los niveles de LDL-c. Estudios experimentales con animales y datos epidemiológicos han relacionado las variaciones comunes en los genes que codifican para los transportadores de membrana ABCG5 y el ABCG8, implicados en el eflujo de colesterol, con diferencias interindividuales en las concentraciones plasmáticas de fitosteroles y en consecuencia con la absorción de colesterol.

Objetivos. Nuestro objetivo ha sido investigar la influencia de las variantes D19H, y A632V en el gen ABCG8 en las concentraciones de lípidos plasmáticos, tras suplementación de 2g/día de fitoesteroles.

Métodos. Se seleccionaron 71 personas adultas de población general de Valencia (32 hombres y 39 mujeres) con edades comprendidas entre 18 y 71 años (media de edad 41±11años), con hipercolesterolemia moderada o normocolesterolemia. Los participantes consumieron un suplemento de 2g/día de fitoesteroles durante 3 meses. Se obtuvieron datos sobre variables sociodemográficas, de estilos de vida y bioquímicas (colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos, colesterol VLDL, glucemia, apolipoproteína A, apolipoproteína B y lipoproteína a), a nivel basal y a los tres meses de la intervención. Los genotipos se determinaron mediante PCR-RFLP.

Resultados. Las prevalencias genotípicas del polimorfismo A632V fueron 67%AA, 32%AV y 1.5%VV y las de D19H: 85%DD, 13%DH y 1.5%HH. No hubo diferencias estadísticamente significativas por genotipo en la media de las variables bioquímicas estudiadas en ninguno de los dos polimorfismos al inicio del estudio. Tras el periodo de intervención, se observaron descensos estadísticamente significativos en las concentraciones de C-LDL y apolipoproteína B. Al analizar la posible modulación por los polimorfismos estudiados, se observó una menor tendencia en la disminución de las concentraciones de c-LDL en los portadores del alelo 632V, sin alcanzar la significación estadística. Con relación al polimorfismo D19H, se observó que los portadores del alelo 19H, respecto a los homocigotos no mutados, no disminuían las concentraciones de C-LDL, aunque no se alcanzó la significación estadística.

Conclusiones. El efecto hipolipemiante de los fitoesteroles de la dieta podría estar modulado por las variaciones A632V y D19H del gen ABCG8.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos P11A2005-07 (UJI-BANCAJA), GEN2006-26420-E_PIA42006-7 (Ministerio de Educación y Ciencia), COMBIOMED (RD07/0067/0006, ISCIII-FIS, Ministerio de Sanidad) y CIBER "Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición" (ISCIII-FIS, Ministerio de Sanidad).

Estudios genómicos sugieren la existencia de diferentes formas de transcribir los genes en levadura.

Vicent Pelechano¹, Silvia Jimeno², José García-Martínez³, José E. Pérez-Ortín¹ y Sebastián Chávez².

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València.* ²*Departamento de Genética. Universidad de Sevilla.* ³*Servicio de Chips DNA-SCSIE. Universitat de València.*

Hemos puesto a punto un método para la determinación a escala genómica del enriquecimiento en una proteína en la cromatina de los genes de levadura (1). Usando esta metodología con la subunidad grande de la RNA pol II (RNA pol ChIP-chip, RPCC) podemos determinar la densidad de polimerasas sobre cada gen y, por tanto, su tasa de transcripción. El resultado de este estudio en condiciones de crecimiento exponencial en medio completo se ha comparado con el obtenido mediante un método alternativo (GRO) basado en run-on (2). La conclusión principal es que ciertos grupos de genes (los que codifican proteínas ribosomales sobre todo) tienen una mayor proporción de polimerasas no elongantes e hipofosforiladas. El estudio de la distribución del complejo FACT (Spt16p) a escala genómica, así como el estudio de las consecuencias de su depleción sobre la tasa de transcripción sugieren también que los genes de las proteínas ribosomales tienen una diferente proporción y dependencia de FACT que el promedio de los genes. Finalmente la comparación de nuestros resultados sobre localización genómica de RNA pol II y Spt16p con datos sobre el posicionamiento de nucleosomas (3) sugiere que los genes con caja TATA en su promotor, que suelen presentar nucleosomas posicionados (aunque de forma "borrosa") en el extremo 5' de su región transcrita, son más dependientes de FACT y son más pobres en polimerasas hipofosforiladas y no elongantes. Postulamos que la maquinaria general de transcripción (dependiente de la RNA pol II) no actúa de manera uniforme en todo el genoma, sino que existen diferencias importantes entre grupos funcionales de genes en cuanto a la forma de ser transcritos.

1.- Rosaleny, L.E.; Ruiz-García, A.B.; García-Martínez, J.; Pérez-Ortín, J.E. y Tordera, V. (2007). *Genome Biol.* (en prensa). 2.- García-Martínez, J., Aranda, A. y Pérez-Ortín, J.E. (2004). *Mol. Cell* 15, 303-313. 3.- Albert I, Mavrich TN, Tomsho LP, Qi J, Zanton SJ, Schuster SC, Pugh BF. (2007). *Nature* 446:572-576.

A new 20K Citrus Microarray for gene expression analysis

Martínez, M.A., Mauri, N., Marques, M.C., Santiago, J., Juárez J., L. Forment, J., Gadea, J.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. Ciudad Politécnica de la Innovación. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, ESPAÑA.

We describe the design and generation of a publicly available cDNA microarray that include 21.081 putative unigenes of Citrus. This new tool replaces the first 7K microarray generated two years ago (Forment et al, 2005) and allows gene expression analysis at a more global scale. The unigenes represented in the microarray were selected from the 92.011 ESTs of the Citrus Functional Genomics Consortium, following a rational design to minimize cross-hybridisation. A web-browseable database (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB>) was created and populated with information about the unigenes represented in the microarray, including cDNA libraries, isolated clones, raw and processed nucleotide and protein sequences, and results of all the structural and functional annotation of the unigenes, like general description, BLAST hits, putative Arabidopsis orthologues, microsatellites, putative SNPs, GO classification and PFAM domains. We show how this microarray offers a good representation of the citrus genome and present the usefulness of this genomic tool for global studies in citrus.

ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES INDUCIDA POR EL ÁCIDO RETINOICO EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA

Emilio J. Laserna¹, Luz Valero², Manuel Sánchez del Pino², Juan J. Calvete³ y Domingo Baretino¹

¹Unidad de Biología de la Acción Hormonal. Dept. de Patología y Terapia Molecular y Celular. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España). ²Unidad de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Av. Autopista del Saler, 16. 46023 Valencia (España). ³Unidad de Proteómica Estructural. Dept. de Genómica y Proteómica. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España).

El Ácido Retinoico (RA), la forma activa de la vitamina A, induce en células de neuroblastoma SH-SY5Y la diferenciación neural. Además de sus acciones transcripcionales clásicas regulando la expresión de genes concretos, el RA actúa también de un modo extra-genómico, modulando la actividad de rutas de transducción de señal. En particular, el tratamiento con RA activa la vía de señalización PI3K/Akt y de la MAP quinasa ERK, siendo la activación de la primera un requisito necesario para la diferenciación neural. Para intentar descubrir proteínas novedosas diana de las acciones no genómicas del RA, iniciamos un abordaje proteómico, basado en la comparación de geles bidimensionales de extractos de fosfoproteínas nucleares (control y tratadas 30 min con RA) purificadas por cromatografía de afinidad. Esta estrategia nos permitió identificar por espectrometría de masas una serie de proteínas que varían su fosforilación en respuesta al tratamiento con RA: nucleofosmina/B23, hnRNP-C1/C2, hnRNP-K, HMGB1, PABP2 y la histona H1.5. La fosforilación de estas proteínas ha sido estudiada más a fondo mediante experimentos de desplazamiento horizontal en western blot bidimensional e inmunoprecipitación. Con el objetivo de superar las limitaciones que tiene esta estrategia proteómica tradicional y ampliar los resultados obtenidos, se recurrió a un ensayo LC-MS/MS basado en el iTRAQ (isolated tags for relative and absolute quantification) partiendo igualmente de proteínas nucleares previamente enriquecidas en fosfo-proteínas por cromatografía de afinidad. El iTRAQ permite cuantificar la cantidad relativa de proteínas hasta en cuatro muestras distintas. El número de proteínas identificadas es mucho mayor y los valores relativos para la cuantificación son muy precisos y sometidos a un test estadístico para hallar su significación. El análisis preliminar de los resultados obtenidos hasta el momento muestra que proteínas pertenecientes a un mismo grupo sufren modificaciones en su estado de fosforilación similares. Ambas estrategias conducen hacia la hipótesis de que el RA podría influir en la respuesta transcripcional asociada a la diferenciación a través de la fosforilación de proteínas nucleares, bien factores de transcripción específicos, bien proteínas que participan en procesos más generales (modificación de cromatina, procesamiento de mRNA, transporte al citoplasma, etc.).

Regulación post-transcripcional durante el cambio de fuente de carbono por Pub1p.

Helena Orozco, José E. Pérez-Ortín y Paula Alepuz.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València.

La fuente de carbono presente en el medio condiciona el patrón de expresión génica de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En presencia de glucosa, se produce la fermentación de éste azúcar y genes implicados en metabolismos alternativos se encuentran reprimidos. El paso de las células de un medio con glucosa a un medio con glicerol produce la activación de numerosos genes necesarios para la asimilación de esta fuente de carbono, desde transportadores de membrana a proteínas del metabolismo respiratorio y de gluconeogénesis. Aunque el control transcripcional parece ser un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica dependiendo de la fuente de carbono, varios estudios demuestran que el control de la estabilidad de los mRNAs juega un papel importante en dicha regulación. La proteína de unión a RNA Pub1, homóloga a las proteínas TIA-1/TIAR y HuR de mamíferos, se ha implicado en la estabilización de algunos transcritos en medios con glucosa. El objetivo de este trabajo es estudiar la función de Pub1 en el control de la estabilidad de los mRNA en función de la fuente de carbono. Para ello hemos realizado un estudio genómico para medir las tasas de transcripción y las estabilidades de todos los transcritos en células salvajes y mutantes *pub1Δ* en medios con glucosa y con glicerol. Nuestros datos genómicos y fenotípicos indican que la proteína Pub1 es clave en la regulación de la estabilidad de mRNAs necesarios para adaptarse al tipo de fuente de carbono disponible en el medio.

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DURANT LA DIFERENCIACIÓ DE CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y INDUÏDA AMB ÀCID RETINOIC

Salvador Meseguer, Núria Ruiz i Domingo Baretino

Unitat de Biologia de l'Acció Hormonal. Departament de Patologia i Teràpia Molecular i Cel·lular. Institut de Biomedicina de València (CSIC). Jaume Roig, 11. 46410 València (Espanya).

L'Àcid Retinoic (RA) actua com a regulador fisiològic d'un gran nombre de processos entre ells, la diferenciació neuronal. Els mecanismes moleculars que induïxen a la cèl·lula a diferenciar-se com a conseqüència de l'acció del RA no estan clarament establerts. Des de fa alguns anys el nostre grup s'ha centrat en l'estudi d'aquests mecanismes utilitzant com a sistema model les cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y. Els resultats obtinguts fins ara confirmen la implicació no sols de les accions clàssiques genòmiques, sinó a més a més la participació d'accions ràpides extra-genòmiques durant aquest procés de diferenciació. Concretament s'ha identificat l'activació ràpida de la ruta de senyalització de la PI3K/AKT, una activació que resulta ser necessària per la inducció de la diferenciació neuronal i que té lloc a través de la interacció directa del Receptor d'Àcid Retinoic (RAR) amb la subunitat reguladora de la PI3K. La integració d'ambos mecanismes d'acció del RA, genòmics i extra-genòmics condueixen al inici dels programes de supervivència i diferenciació de les cèl·lules que originen canvis en l'expressió gènica. Mitjançant la tecnologia de microarrays d'Affymetrix hem identificat 140 gens diferencialment expressats durant el tractament amb RA i distribuïts en tres patrons d'expressió gènica clarament definits: gens d'expressió ràpida, intermèdia i tardana. L'anàlisi funcional dels gens de cada patró revelen que: els gens d'expressió ràpida participen especialment en processos de processament de RNA i d'apoptosis, els d'expressió intermèdia estan implicats principalment en processos de desenvolupament, diferenciació i metabolisme del RA, i finalment els gens d'expressió tardana participen fonamentalment en metabolisme, especialment de lípids i en quimiotaxis. Per tal d'establir possibles punts d'interacció entre l'activació de vies de senyal per RA (accions extra-genòmiques del RA) i l'activació transcripcional regulada per RAR (accions genòmiques) s'ha estudiat l'efecte dels inhibidors de les principals rutes de senyalització sobre l'expressió gènica. Concretament, en aquest estudi ens ha permès identificar que l'activació de la PI3K/AKT exerceix un efecte inhibidor en l'expressió d'alguns gens d'expressió intermèdia i tardana, entre ells, RARB. Aquest fet podria intentar justificar-se dins d'un context complex de regulació transcripcional, en el que la fosforilació d'algun component transcripcional per la via PI3K/AKT podria afectar negativament a l'expressió d'aquests gens.

Identificació i seqüenciació de les regions riques en gens del Cromosoma 9 de tomata

Micó¹, S. Osorio¹, C. Pons¹, V. Fernández², S. Zúñiga², A. Perez², F. Camara³, R. Guigó³, A. Granell¹.

¹BMCP, CSIC-UPV de Valencia; ²Sistemas Genómicos, ³IMIM.

El genoma de la tomata compren aproximadament uns 950 Mb de DNA, dels quals més del 75% correspon a la heterocromatina, on no hi ha pràcticament seqüències gèniques. La major part del gens es troben a la eucromatina, que al cas de la tomata està agrupada en regions de gran tamany contigües i localitzades a les zones distals dels braços cromosòmics. S'ha establert un consorci internacional de centres de seqüenciació i nosaltres participem seqüenciant el Chr9. El objectiu és seqüenciar BAC a BAC els aproximadament 220Mb d'eucromatina, partint d'uns 1500 BAC "llavor" que han estat ancorats individualment al mapa d'alta densitat de tomata utilitzant la població F2 de *L. esculentum* x *L. pennellii* (referida com a població F2.2000). Informació adicional prové tant de BACs com de marcadors ancorats al cromosoma i ha estat proporcionada per Syngenta o Kazusa. La disponibilitat de pools de BACs que representen 15x el genoma de la tomata, així com la seqüència obtinguda per a 400,000 extrems de BACs (BES), i un fingerprint contig FPC per a gran nombre dels BACs permet radiar des dels BACs llavor seqüenciats cap al seqüent BAC de extensió que mostrarà un solapament mínim. Un subconjunt dels BACs a seqüenciar és utilitzat mitjançant la tècnica d'hibridació en cromosomes paquimens (FISH) per a guiar el procés de selecció i extensió dintre de la regió eucromàtica de cada cromosoma. El projecte compleix una sèrie comú de standards de seqüenciació, acabat, nomenclatura i anotació genica, tant funcional com estructural. La informació de la seqüència es fa pública i visible amb diferents eines al portal de SGN, així com altres informacions genòmiques associades.

Canvis moleculars, a nivell de RNA, subjacents al desenvolupament del “dany per fred” o “tolerància” al fred en fruits de mandarina clementina emmagatzemats a baixes temperatures.

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* *

*Institut de Biologia Molecular y Cel·lular de Plantes (UPV/CSIC). València. §Institut de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Valencia. ◇Aristotele University of Thessalonika. Thessalonika. Grècia

Les baixes temperatures son uns dels principals factors que limiten el desenvolupament de les plantes. El creixement vegetatiu i el desenvolupament d'òrgans pot ser segrestat o danyat per les baixes temperatures, mentre que localment poden produir clorosis o necrosis, indicant mort cel·lular induïda per les baixes temperatures. El nostre interès es centra en els programes moleculars que operen al pericarpí acolorit dels fruits dels cítrics (flavedo), un teixit que protegeix el fruit dels estressos ambientals. A pesar de tot l'armament anti-estrès del que disposa, el flavedo de molts fruits cítrics tals com les mandarines, pomelo, llimes i llimons poden ser danyats per diferents condicions d'estrès, incloent les baixes temperatures inferiors als 8-10°C o temperatures de refredament (TR). Les evidències moleculars que fins ara es tenen indiquen que, les TR, produeixen una parada de la maduració així com una inducció de les rutes de biosíntesis de fenilpropanoids i etilé. A part d'açò, poc més es sap sobre el mecanisme molecular que opera en el flavedo en resposta a les temperatures de refredament. Per identificar els canvis moleculars associats a la resposta del flavedo a les TR, nosaltres hem analitzat els patrons de expressió dels missatgers del flavedo de dos cultivars que difereixen en la sensibilitat a les LT utilitzant una micromatriu dedicada (chillma). Els objectius d'aquest estudi son (a) estudiar si les diferències genètiques inicials contribueixen a la tolerància al fred (b) comparar la resposta al fred del cultivar sensible amb el de la tolerant (c) identificar gens del flavedo relacionats amb el desenvolupament del dany per fred o amb l'aclimatació a BT (d) veure si les baixes temperatures de dany i no dany activen el mateix programa molecular (e) veure fins quin punt el programa de resposta al fred dels fruits cítrics (llargs temps d'exposició i foscó) s'assembla al programa molecular d'aclimatació descrit pels òrgans vegetatius exposats temps curts i amb llum. Presentarem els resultats obtinguts amb l'anàlisi de micromatrius i discutirem la informació desvetllada sobre els mecanismes moleculars que operen en la resposta del flavedo dels fruits cítrics a les baixes temperatures d'emmagatzemament.

GENTISIC ACID AS A SIGNAL MOLECULE IN THE DEFENSIVE RESPONSE OF TOMATO PLANTS.

Díez-Díaz, M., Marqués, M.C., Granell, A., Gadea, J., Rodrigo I., Conejero, V.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Ciudad Politécnica de la Innovación. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, ESPAÑA.

Plants have a great ability to cope with environmental stresses by means of a broad array of constitutive and inducible defence strategies, the latter including among others, the synthesis of antimicrobial compounds and the accumulation of pathogenesis related (PR) defence proteins. It is well established that salicylic acid (SA) plays an important role in the activation of the plant defence response. On the other hand, in our laboratory we have shown that gentisic acid (GA), a biosynthetic derivative of SA, accumulates at high levels in tomato plants infected with non-necrotizing pathogens such as citrus exocortis viroid (CEVd) or tomato mosaic virus (ToMV). In these plants, GA increases more than 150-fold above basal levels in response to CEVd and ToMV infections, accumulating up to 50-fold more than SA. Interestingly, using conventional techniques, we also found that GA triggers some differential PR proteins as compared to SA. This indicates that SA and GA may play complementary signalling roles in the activation of the inducible defences of tomato (Bellés et al., 1999). In order to further characterize the role of GA and SA in tomato plants, we are developing a transcriptomic approach, which will provide information on genes up- and down-regulated by these signal molecules both in early and late defence responses. We are using a microarray containing 12612 tomato oligonucleotides corresponding to 11862 genes and 300 controls. The oligonucleotides, which are 70 bp-long, have been synthesized according to gene sequences available in the Tomato Database at Cornell University and GenBank. We have found that, from the total of 781 genes regulated by GA, more than 40 genes are differentially regulated by GA and not by SA. Among them, we can find transcription factors, and defensive proteins such as PR proteins, proteinase inhibitors, chitinases or polyphenol oxidase.

Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Molina, P., Primo, J., and Conejero, V. 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 227-235.

Belles, J.M., Garro, R., Pallas, V., Fayos, J., Rodrigo, I. and Conejero, V. 2006. Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta.* 223(3):500-11.

Fayos, J., Belles, J.M., Lopez-Gresa, M.P., Primo, J. and Conejero V. 2006. Induction of gentisic acid 5-O-beta-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry.* 67(2):142-8.

Proyecto Genoma *Legionella pneumophila* Alcoy; estudio de Pan-genoma, factores de virulencia y inmunidad bacteriana.

Giuseppe D'Auria, Nuria Jiménez, Francesc Peris-Bondia, Andrés Moya y Amparo Latorre

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia

Legionella pneumophila es un parásito intracelular de protozoos de agua dulce que, con mecanismos parecidos, puede desarrollar su ciclo vital en células de mamíferos. En humanos es responsable de la "Legionelosis". Cuando agua infecta es inhalada en forma de aerosol^{1,2}, la enfermedad se manifiesta en personas susceptibles, causando una forma de neumonía. Se han caracterizada 48 especies en el género de *Legionella*³, la mitad de las cuáles son responsables de infecciones en humanos. Se han descrito 15 serogrupos de *L. pneumophila* con diferentes niveles de patogenicidad y en el 84% de los casos reportados, la Legionelosis es debida a cepas del serogrupo 1. *Legionella pneumophila* sigue siendo causa de importantes eventos epidemiológicos en el mundo. Por sus graves infecciones la Legionelosis es un problema actual de fuerte impacto social. En 2001, se produjo en Murcia⁴ uno de los brotes más importantes, donde más de 650 personas fueron infectadas y 4 fallecieron. Aunque el brote de Legionelosis de Murcia fue el más trágico, Alcoy (Alicante) cuenta con el mayor número de brotes repetidos en el tiempo y desde su primera aparición en 1999 han sido declarados 12 brotes infectivos de *Legionella* con más de 200 personas infectadas y 12 fallecidos. Aquí presentamos el estado actual del proyecto genoma de la cepa de *Legionella pneumophila* 2300/99 aislada a partir de un paciente infectado durante el primer brote de Alcoy en 1999. Figuran los primeros datos relativos a la estructura del genoma y se describen varias regiones involucrada en la virulencia de esta cepa. Algunos ejemplos son: i) los sistemas de transporte de tipo II y tipo IV, ambos necesarios para la infección; ii) una región que codifica para una toxina, caracterizada por estructuras repetidas altamente conservadas (rtx)⁵; iii) una región que comprende un sistema de inmunidad viral llamado CRISPR ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"). Además se presenta un análisis comparativo con otras cepas ya secuenciadas (Lens, Paris, Philadelphia y Corby).

1. Fields BS, et al.; Clin Microbiol Rev. 2002 Jul;15(3):506-26
2. Steinert M, et al.; FEMS Microbiol Rev. 2002 Jun;26(2):149-62
3. Yu VL, et al.; J Infect Dis. 2002 Jul 1;186(1):127-8
4. Cano PR and Joseph C; Eurosurveillance Weekly
- 5 2001 010712 5. D'Auria G, et al., BMC Genomics 2008: 9:14

Genome analysis of the cockroach endosymbiont *Blattabacterium* sp.

Alexander Neef, M^a José López-Sánchez, Miguel Pignatelli, Javier Tamames, Amparo Latorre, and Andrés Moya,
Cavanilles Institute for Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Spain

More than 20% of the insects live in a symbiotic relationship with bacteria. This is probably one of the key factors of their evolutionary success. As a consequence of the adaptation of the bacteria to intracellular life, many molecular, structural, and biochemical changes occurred in their genomes. The most obvious change is the reduced genome size due to a massive loss of genes. Cockroaches host in their abdominal fat body bacterial endosymbionts that are flavobacteria. These bacteria belong to the phylum Bacteroidetes in contrast to all other insect endosymbionts so far intensively genome-studied that are gamma-proteobacteria. Previously, we determined the size of the genome of the blattabacteria of *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, and *Blatta orientalis* as 650 +/- 15 kb indicating a reduced genome like it is typical for obligate endosymbionts of insects. We have sequenced the complete genome of the not-culturable blattabacterial endosymbiont of *B. germanica* with the goals to learn about the specific adaptations that developed during the co-evolution 'blattabacteria ? cockroach' in comparison to the gamma-proteobacterial endosymbionts as well as to reveal the so far unknown function(s) of the symbiont for the host via the annotation of the entire genome. Sequencing was done using a combined approach of classic Sanger and the novel pyro-sequencing. The circular genome has a size of 638 kb. The %G+C content is 28%. Using Glimmer3 we could identify 680 ORFs for proteins; There exists one copy of each rRNA molecule, that are organised in an operon. The program Bruce1.0 predicted 34 tRNAs. Preliminary gene annotation done so far identified about 400 protein genes. However, the isolated phylogenetic position of the blattabacteria within the Bacteroidetes hampers the analysis and makes it necessary to use a specified set of bioinformatic analysis. Characterization of the blattabacteria genome and comparison with other Bacteroidetes and insect endosymbionts will give insights on the evolutionary processes involved in the adaptation of blattabacteria to cockroaches and will tell us if these endosymbionts have undergone transformations in their genomes similar to the gamma-proteobacterial symbionts revealing a case of convergent evolution on a genomic scale.

Proteomics and related approaches as tools for the identification and characterization of the metallocarboxypeptidase SmCP and the bifunctional inhibitor SmCI from the Annelid *Sabellastarte magnifica*

Maday Alonso del Rivero¹, Sebastián Alejandro Trejo², Mónica Rodríguez de la Vega², Francesc Canals³, Julieta Delfín¹, Joaquín Díaz¹, María Ángeles Chávez¹ and Francesc Xavier Aviles²

¹ Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

³ Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

² Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles. Spain

After screening along twenty five marine invertebrates, a novel metallocarboxypeptidase (SmCP) and a new bifunctional inhibitor (SmCI) have been identified by activity and mass spectrometry analytical approaches in the marine annelid *Sabellastarte magnifica*. The molecular complexity of the *S. magnifica* extracts (both from the body and from the crown, or mixed) was evidenced by 2D-PAGE analysis, combining isoelectric point and molecular mass separation in the two axis. Overall, more than 200 protein species were detected by this procedure, among which the ones in the 18-27 kDa range are the most prominent. Noteworthy, that the band corresponding to the SmCP enzyme, did not appear at around 34 kDa, the mass assigned to it as a potential metallocarboxypeptidase, probably because of the lower abundance of this protein in the body extract. However, the SmCI inhibitor is present in a higher levels than the other proteins of the tentacle crown, probably related to its function in this tissue.

SmCI, an inhibitor of 19.7 kDa (MALDI-TOF mass spectrometry) with 18 cysteine residues involved in 9 disulfide bonds, revealed the presence of three Kunitz domains and a high homology with other Kunitz serine inhibitors. Kinetic and structural results have shown that SmCI is a novel serine/carboxy bifunctional inhibitor, active against both, pancreatic CPA and serine proteinases such as trypsin, chymotrypsin and pancreatic elastase.

SmCP is a protease of 33792 Da, displaying N-terminal and internal sequence homologies with M14 metallo carboxypeptidase like enzymes (CPs), as determined by mass spectrometry and automated Edman degradation. The enzyme is drastically inhibited by metal chelators and it is also strongly inhibited by specific inhibitors of CPs, as benzylsuccinic acid and the protein inhibitors isolated from potato (PCI) and leech (LCI) (both at nanomolar levels). The enzyme displays high peptidase efficiency towards pancreatic carboxypeptidase A (CPA) synthetic substrates, such as those with hydrophobic residues at C-terminus but, remarkably, also against the acidic ones; this property, as described for CPO like activity, has been shown on long peptides by mass spectrometry and represent a CP with a wider specificity not described before.

The growing application of genomics and related technologies is facilitating an expanded view of the enzymatic families and in particular of proteases, such as metallocarboxypeptidases and its inhibitors. We are still far from a consistent characterization of the "degradomes" of invertebrates (the genomically and proteomically related complement of proteolytic enzymes), as it is performed nowadays in higher eukaryotes. Surely, it would be interesting biologically and biotechnologically.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by International Foundation of Science, Sweden (by Grants F3342-1 and F3276-1), by grant BIO2004-05879 (Ministerio de Educación y Ciencia-CICYT, Spain), and by Xarxa Referència de Biotecnologia (XeRBa, Generalitat de Catalunya). M.A. Chavez acknowledges a Visitor Grant from AGAUR (Generalitat de Catalunya). We are grateful to Dagmara Diaz and Rachel Lopez for technical support.

Póster nº 16

Effect of the chronic nitric oxide on the platelet proteome of thrombin activated platelets

T Padró T, E Peña, G Vilahur, R Suades, L Badimon

Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC). Hospital Santa Creu i San Pau, Barcelona, Spain

Background and Objectives: Platelets are involved in the generation of thrombotic disorders and clinical presentation of heart disease. Nitric oxide donors (NOd) have demonstrated an effective inhibitory effect on platelet function and thrombosis. However, the cellular processes involved are not fully understood. In this study, we investigated the effect of NO administration on the proteomic profile of platelets obtained from healthy pigs that had chronically received a NOd.

Methods: Proteins were obtained by sequential extraction (cytosol-fraction and membrane/cytoskeleton-enriched fraction) from resting and thrombin (0.4 NIH U/4x10⁵ platelets) activated platelets. Platelets were obtained before (day 0) and after 8 days oral administration of NOd (LA-419, 0.9 mg/Kg/day). Differential protein patterns were investigated by 2D-electrophoresis and Western Blot. Protein identification was achieved by peptide mass fingerprint (Ettan MALDI-TOF).

Results: Chronic dNO treatment modified the response to thrombin of 24 protein species related to actin assembly, signaling, and metabolic activity in platelets. Interestingly, gelsolin in the cytoskeleton fraction was significantly reduced and filamin in the cytosol-fraction significantly increased in thrombin-stimulated platelets of untreated animals in comparison to the NOd-treated animals. Besides, signaling-proteins as PI3-K and 14-3-3zeta which translocate to membrane in activated platelets were significantly decreased in cytosol-fraction of thrombin-stimulated platelets of non-NOd treated animals compared with those receiving the NO donor. Furthermore, in the presence of the NO donor the release of the protein-thiol-isomerase (PDI) was decreased, this protein facilitates crosslinking between thrombin and thrombospondin and therefore platelet aggregation.

In summary, our results suggest that chronic oral administration of the NO donor, at doses that inhibit platelet aggregation and thrombosis, induces passivation of platelets in response to agonists as thrombin.

Proteomic identification in marine invertebrates of metallo.carboxy-peptidases, cysteine proteases and their inhibitors with potential biomedical applications

Giovanny Covalada¹, Sebastián Alejandro Trejo¹, Mónica Rodríguez de la Vega¹, Julia Lorenzo¹, Joaquín Díaz², Maday Alonso del Rivero², Francesc Xavier Aviles¹, María Ángeles Chávez²

¹ *Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles. Spain*

² *Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba*

The importance of protease inhibitors (PI) is tightly linked to their molecular counterparts: the proteases. Approximately 2% of the genes in most organisms are proteases.¹ Therefore, PI are very attractive molecules, due to their multiple biotechnological and biomedical applications. Drug screening usually involves a binding assay that determines the occurrence and the strength of affinity shared between the potential drug and the binding target.²

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) is a suitable analytical technique for ligand screening owing to its extremely high resolution and sensitivity (and thus low sample requirement), its fast analysis and its easy automation,³ which facilitates the use of high-throughput protocols. In view of this, has recently been established a MALDI-TOF MS affinity-based test called intensity-fading (IF) MALDI-TOF MS to study protein ligand interactions.⁴

This research was carried out by a screening of 23 marine invertebrate extracts, using enzymatic kinetics methods and IF MALDI-TOF MS technique that included an affinity step (with the protein receptor bound to a solid support, e.g., agarose/sepharose beads)⁴ to resolve the target–ligand complex from unreacted analytes followed by analysis with MALDI-TOF MS.⁵ We evaluated the enzymatic activity carboxypeptidase A (CPA), carboxypeptidase B (CPB), papain and its PI, as well as resolution of their molecular binding. The results indicated that this source is mainly rich in CPA and papain inhibitors, compared to CPB inhibitors and enzymatic activities.

Acknowledgment

This research was partially supported by the following grants: *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca (AGAUR)*, PIV 2006, *Universitat Autònoma de Barcelona*, FI 2006

References

1. Hedstrom, L. (2002), Introduction: Proteases, *Chem. Rev.* 102 (12), 4429-4430.
2. Lenz, G.R. *et al.* (2000), Chemical ligands, genomics and drug discovery. *Drug Discov. Today* 5, 145–156
3. Mann, M. *et al.* (2001), Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437–473
4. Yanes, O. *et al.* (2007), Detection of non-covalent protein interactions by 'intensity fading' MALDI-TOF mass spectrometry: applications to proteases and protease inhibitors, *Nature Protocols* 2, - 119 - 130
5. Yanes, O. *et al.* (2005). Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1602–1613

UNITAT DE PROTEÒMICA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Oreto Antúnez

*Servei Central de Suport a la Investigació Experimental. Universitat de València,
(oreto.antunez@uv.es)*

La Proteòmica és una àrea de la Biologia que té com a objectiu general l'estudi a gran escala de les proteïnes expressades per un organisme en un moment donat i sota determinades condicions ambientals, i de manera particular la seua estructura i funció. L'estudi del proteoma es considera, després de l'aproximació genòmica, el pas següent en l'estudi dels sistemes biològics, i obri un nou camp d'investigació que supera en envergadura i complexitat el del genoma. En comparació al component genètic, el conjunt de proteïnes d'un organisme presenta una gran variabilitat en funció de factors tan diversos com la modificació post-traducciona, l'estructura tridimensional i la capacitat d'interacció amb altres proteïnes, trets que, tots d'una, condicionen les diferents proteïnes d'un organisme a l'hora d'exercir la seua funció. En els darrers anys s'ha incrementat l'interés de la comunitat científica en l'estudi del proteoma, ja que genera un coneixement funcional d'un organisme més a fons que la Genòmica.

El Laboratori de Proteòmica de la Universitat de València ha sigut creat amb l'objectiu d'oferir als investigadors una infraestructura completa en el camp de la Proteòmica. En aquest sentit, aquesta Unitat de Proteòmica ofereix, tant a la comunitat científica com a les empreses privades, la tecnologia necessària per dur a terme una àmplia diversitat d'estudis proteics, des de la separació i l'anàlisi d'expressió proteica diferencial per mitjà de l'ús de l'electroforesi bidimensional, acoblada o no a la tecnologia DIGE, fins a l'anàlisi per espectrometria de masses que, a través d'estudis d'empremta peptídica, o seqüenciació *de novo* seguida per recerca en bases de dades, permeten la identificació i caracterització de les proteïnes presents en mostres proteiques complexes.

The Arginine Dihydrolase Pathway in *Mycoplasma penetrans*

Raquel Planell, Mario Ferrer-Navarro, Oscar Q. Pich, Raul Burgos, Maria Lluch-Senar, Jaume Piñol, Enrique Querol, Josep A. Perez-Pons.

Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: +34935811331, Email: raquel.planell@uab.es

Mycoplasma penetrans belongs to the class Mollicutes, one of the smallest free-living, self-replicating prokaryotes known. Mollicutes have a small genome, lacking most of the metabolic pathways used for energy requirements and synthesis of cell components common in other bacteria. Mycoplasma species can be divided into two broad metabolic groups, those which ferment glucose (glycolytic or fermentative species) and those which do not (nonglycolytic or nonfermentative species). The nonglycolytic mycoplasmas utilize arginine as a major carbon source through the arginine dihydrolase pathway (AD). *Mycoplasma penetrans* is capable of fermenting glucose as well as degrading arginine but little is known about its biochemistry and metabolism.

We have studied the AD pathway in *Mycoplasma penetrans* and its effect on its growth. We have also characterized the AD operon by molecular biology techniques and finally we have localized several isoforms of the proteins of this pathway in narrow pH gradient 2D gels.