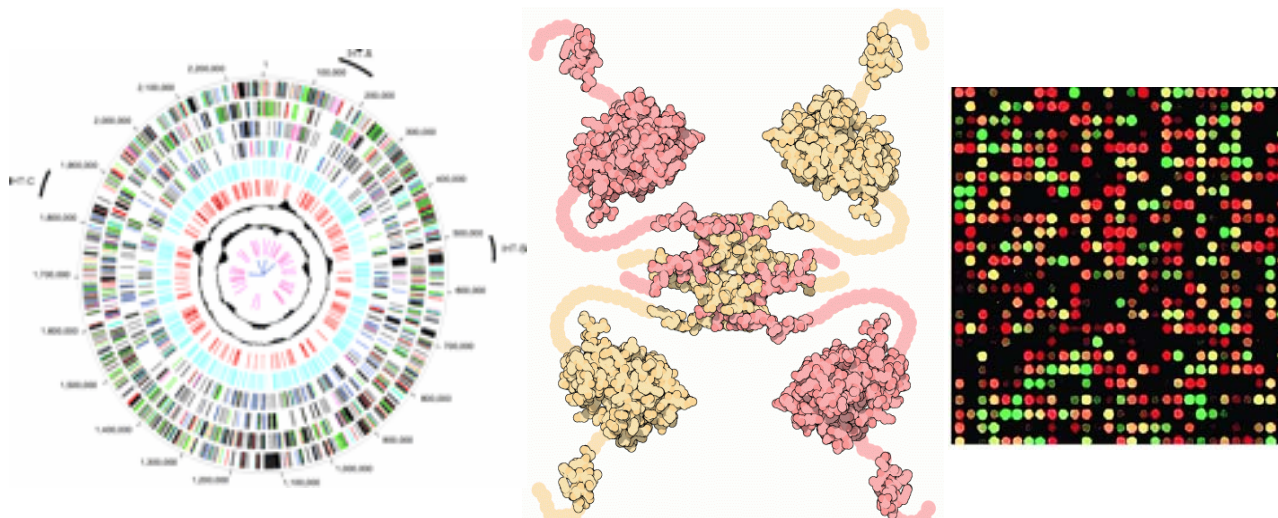


RED VALENCIANA DE



GENÓMICA Y PROTEÓMICA

SÉPTIMA REUNIÓN DE LA RED VALENCIANA DE GENÓMICA Y PROTEÓMICA

Salón Charles Darwin de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València.

12 de Noviembre de 2009



Patrocinadores:



PROGRAMA DE LA JORNADA

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: Ismael Mingarro y Juanjo Calvete

9:30 h. Felix Elortza, Proteomics Core Facility. CIC bioGUNE. *Derio*.

Proteomics at the CIC bioGUNE.

10:15 h. Jörg Hoheisel. Functional Genome Analysis. Deutsches Krebsforschungszentrum. *Heidelberg*

Combined studies of microRNA- and messenger RNA-profiles, related epigenetic changes and functional variations in pancreatic cancer

11:00. Descanso para café y visita pósters

11:30. Cesar Llave. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. *Madrid*

Deep-sequencing of small RNAs: insights into the biogenesis and function of plant viral small RNAs.

12:15. David Andreu. DCEXS-UPF-PRBB. *Barcelona*

SPR-MS and CREDEX-MS, two complementary approaches for deciphering protein-sugar interactions

13:00. Descanso para comida y visita pósters. Hay dos autoservicios: Facultad de Farmacia y Facultades de Ciencias (cruzando la vía del tranvía) y un restaurante en el 5º piso del edificio de investigación. Comida para los organizadores e invitados en el autoservicio de la Facultad de Farmacia.

Comunicaciones libres

14:30. Sesión I: Genómica Comparada y Bioinformática. **Moderador:** Rosario Gil

14:30. Marc A. Martí-Renom. Bioinformatics and Genomics Department CIPF. Valencia.
Three-dimensional folding of chromosomal domains in relation to gene expression.

14:48. Sergio López. ICBiBE, Universitat de València.
Secuenciación del genoma de SOPE: estrategias para el análisis de genomas ricos en secuencias de inserción.

15:06. Oscar Coltell. Depto. de Lenguajes y Sistemas Informáticos, Universitat Jaume I, Castellón
*IATSBLAST: Aplicación Web para automatizar e integrar la búsqueda y alineación de intrones de especies de moluscos no secuenciadas contra el portal de la especie *Lottia gigantea**

15:24. Ana Conesa. Bioinformatics and Genomics Department CIPF. Valencia.
Pathway Network Analysis from transcriptomics data

15:42. Sesión II: Proteómica. Moderador: Manuel S. del Pino

15:42. Domingo Barettino. Unidad de Biología de la Acción Hormonal. IBV-CSIC. Valencia.
Nuevas acciones rápidas del Acido Retinoico en la regulación del procesamiento y la traducción de los mRNAs reveladas a través del análisis proteómico de la fosforilación de proteínas nucleares.

16:00. M^a Jesús García-Murría. Servicio de Proteómica. CIPF. Valencia.
Desarrollo de nuevas herramientas proteómicas: etiquetas fluorosas para el marcaje y enriquecimiento selectivo de péptidos.

16:18. José Martín Nieto. Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología. Universidad de Alicante
Análisis proteómico de las alteraciones en la retina de monos modelo de la enfermedad de Parkinson.

16:36. M.L. Valero. Servicio de Proteómica. CIPF. Valencia
Applications and current challenges of proteomic approaches on differential proteomics

16:54. Roque Bru. Departamento Agroquímica y Bioquímica. Universidad de Alicante
iTRAQ-based proteomic dissection of grape berry exocarp during ripening

17:12. Descanso y visita pósters. Coffee-break ofrecido por Life Sequencing.

17:55. Sesión III: Servicios y Redes de Genómica o Proteómica. Moderadora: Laia Pedrola

18:00. Eva Serna. Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina, Universitat de València.
Avances en el análisis multigénico

18:18. Juanjo Calvete. IBV-CSIC. Valencia.
Proteómica nacional: La SEProt, el grupo de Genómica y Proteómica de la SEBBM y ProteoRed.

18:35. Sesión IV: Genómica Funcional. Moderador : Jordi Pérez Tur

18:36. Begoña Aguado. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Madrid.
Splicing alternativo en la región de clase III del MHC

18:54. Ruben Ferrer-Luna. Departamento de Química-Física. Universitat de València.
Genome-wide analysis of Oligodendroglial Tumours. Merging Genomic, Transcriptomic and Metabolomic Data.

19:12. Salvador Meseguer. Unidad de Biología de la Acción Hormonal. IBV-CSIC. Valencia.
Estudio de la expresión de micro-RNAs en la diferenciación celular inducida por Acido Retinoico en células de Neuroblastoma.

19:30. Jordi Durban. IBV-CSIC. Valencia
Caracterización por secuenciación 454 de transcriptomas de la glándula del veneno de serpientes centroamericanas

19:50: Fin de la jornada.

Plenarias

Plenarias

Proteomics at the CIC bioGUNE

Felix Elortza.

Proteomics Platform, CIC bioGUNE, Building 800, Bizkaia Technology Park, 48160, Derio.

felortza@cicbiogune.es

The Proteomics Platform at CIC bioGUNE enjoys state-of-the-art technologies to support research in proteomics. We provide service to any interested scientific agent, and besides, we are currently involved in proteomics methodologies development and different collaborative research projects.

The availability of genomic sequences has boosted the proteomic research as the data obtained from proteins and peptides by mass spectrometry can be directly linked by bioinformatic means to the genomic information. Combining two-dimensional gels with the nano scale liquid chromatography systems coupled on line to latest generation of tandem mass spectrometers (nLC MS/MS), we have obtained the largest to date proteomic catalogue from human endometrial fluid aspirate. Regarding subcellular proteomics, exosomes secreted by primary rat hepatocytes have been for the first time comprehensively characterized by *shot-gun* methodologies.

By analyzing the abundance of proteins under different physiological conditions, or treated in differently, it is possible to identify groups of proteins that are important to those specific conditions. Differential in gel electrophoresis (DIGE) is nowadays the most powerful technique for gel based differential proteomic analysis. Human liver samples of non alcoholic fatty liver disease at different developmental stage have been analysed by DIGE. Ongoing analyses are focused towards the validation of the identified putative biomarkers in this hepatic disease.

Gel free quantification is also another field of interest in our unit. Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) allows to label practically any type of sample and moreover fourplex or octoplex analysis can be performed in a single nLCMS/MS run. These features make of this methodology a very valuable tool in clinical differential proteomics. Several methodological projects have been performed in the iTRAQ context fostering a broader use of this interesting labelling system.

Plenarias

Combined studies of microRNA- and messengerRNA-profiles, related epigenetic changes and functional variations in pancreatic cancer

Jörg D. Hoheisel

*Division of Functional Genome Analysis, Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg, Germany*

Our research aims at the development and application of new technologies for an analysis, assessment and description of both the realisation and regulation of cellular function from genetic information.

Analyses on tumour material are at the center of attention with an emphasis on pancreatic cancer. Parallel studies at a global level are under way on the epigenetic modulation of gene promoters, variations in transcription factor binding, changes of transcript levels of coding and non-coding RNAs, on the actual protein expression and the intensity of protein interactions. We also perform RNAi-screens on pooled cells, each infected with a lentivirus vector construct encoding a different shRNA. From the resulting data, we aim at an understanding of cellular regulation and its biological consequences. In combination with clinical facts, the knowledge is used for the creation of means of early diagnosis, accurate prognosis and the analysis of treatment results as well as the establishment of new therapeutic approaches.

A more recent line of work aims at an *in vitro* implementation of complex biological processes. Motivation is a utilisation for the production of molecules and the establishment of artificial molecular systems. Cell-free biosynthetic production will become important for many biotechnological and pharmacochemical challenges ahead.

Contact:

Jörg D. Hoheisel
Division of Functional Genome Analysis
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 580
D-69120 Heidelberg
Germany

Tel.: +49-6221-42-4680
Fax: +49-6221-42-4687 or -4682
email: j.hoheisel@dkfz.de
http://www.dkfz.de/funct_genome/

Deep-sequencing of small RNAs: insights into the biogenesis and function of plant viral small RNAs.

César Llave

Dpto. Biología de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid, Spain. cesarllave@cib.csic.es

In plants, small RNA-guided processes referred to as RNA silencing control gene expression and serve as an efficient antiviral mechanism. Plant viruses are inducers and targets of RNA silencing as infection involves production of functional virus-derived small interfering RNAs (siRNAs). In this talk, I will describe our research on the structural and genetic components influencing the formation of virus-derived siRNAs. We used a multiplexed, parallel-pyrosequencing strategy to profile the populations of viral siRNAs from virus-infected plants using different plant viruses and host species. Several thousands siRNAs were obtained from each library, with the majority corresponding to unique reads which suggest that our libraries are still far from saturation. Viral siRNAs are mostly 21 nucleotides in length and derive from positive and negative viral RNA strands, although siRNAs of positive polarity are significantly more abundant. Our data demonstrated that the entire viral genomes were covered by siRNAs of the most representative size classes in a way that every single genomic position along the viral genome is susceptible to be targeted by DCL enzymes. Peaks of abundance corresponded to both regions containing a high number of unique sequences or regions represented by highly repetitive reads from a few unique sequences. Using loss-of-function Dicer-like (DCL) Arabidopsis mutants. We found that DCL4, DCL3 or DCL2 targets alone, or in combination, viral templates to promote synthesis of siRNAs of both polarities from all regions of the viral genome. Tobacco rattle virus (TRV) siRNA biogenesis and antiviral silencing is strongly dependent on the combined activity of the host-encoded RNA-dependent RNA polymerases RDR1, RDR2 and RDR6, thus providing evidence that perfectly complementary double-stranded RNA serves as a substrate for siRNA production. We conclude that the overall composition of viral siRNAs in virus-infected plants reflects the combined action of several interconnected pathways involving different DCL and RDR activities.

SPR-MS and CREDEX-MS, two complementary approaches for deciphering protein-sugar interactions

**Carmen Jiménez-Castells¹, Adrian Moise², Beatriz G. de la Torre¹,
Michael Przybylski², Ricardo Gutiérrez-Gallego^{1,3}, and David Andreu¹**

¹ Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University

² Department of Chemistry, University of Konstanz, 78457 Konstanz, Germany

³ Bio-analysis group, Neuropsychopharmacology program, IMIM-Hospital del Mar

^{1,3} Barcelona Biomedical Research Park, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

Interest in lectins (carbohydrate-binding proteins of non-immunological origin) has steadily grown over the last decades because of their decisive role in numerous pathological processes. Examples of lectin-sugar interactions include the recognition occurring during bacterium-host adhesion, viral entry, or metastasis. Concomitantly, the development of new, powerful, nanosized analytical tools to study these interactions has accelerated.

Here, two complementary analytical techniques are described that provide both quantitative and qualitative data on carbohydrate-protein interactions with high sensitivity, low sample consumption, and without sample labelling. With the first technique, based on surface plasmon resonance (SPR), both kinetic and thermodynamic parameters are determined in real time. In this approach, the sugar immobilization through a peptide module^{1,2} allows to capture the carbohydrate-binding protein, to characterize the interaction and, subsequently, to identify the interacted lectin by mass spectrometry.

The second technique employs proteolytic excision of protein-carbohydrate complexes and mass spectrometric analysis (CREDEX-MS)³ and enables the identification of the peptide motifs at the carbohydrate binding site. In this approach, the sugar is immobilized onto a functionalised Sepharose support and the lectin passed through. After on-column digestion of the complex, sugar-bound peptides are eluted and identified³. The identification of the amino acid residues directly involved in the specific interaction may help delineate the minimal structural determinants for the development of pharmaceuticals capable of modulating or inhibiting carbohydrate-targeting pathogens.

In the talk, the combination of these two methodologies for sugar-protein interaction studies and their applicability will be described with legume lectins as test models.

¹ Vila-Perelló, M., Gutiérrez-Gallego, R., Andreu, D. *Chembiochem* 6, 1831-1838 (2005)

² Jiménez-Castells, C., de la Torre, B.G., Gutiérrez-Gallego, R., Andreu, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5155-5158 (2007)

³ Przybylski M., Moise A., Svobodova E., Siebert H., Gabius H. *J Pept. Sci. Supplement to Vol. 14*, 40 (2008)

Comunicaciones libres

Three-dimensional folding of chromosomal domains in relation to gene expression

Davide Baù¹, Amartya Sanyal², Bryan Lajoie², Emidio Capriotti¹, Job Dekker^{2*}, and
Marc A. Marti-Renom^{1*}

1. Structural Genomics Unit, Bioinformatics and Genomics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe, 46012 Valencia, Spain. 2. Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Program in Gene Function and Expression, University of Massachusetts Medical School 01605-2324 Worcester MA, USA.

Summary

The genome three-dimensional (3D) organization plays important, yet poorly understood roles in gene regulation. Chromosomes assume multiple distinct conformations in relation to the expression status of resident genes and undergo dramatic alterations in higher order structure through the cell cycle. Despite advances in microscopy, a general technique to determine the 3D conformation of chromatin has been lacking. We developed a new method for the determination of the 3D conformation of chromatin domains in the interphase nucleus, which combines 5C experiments with the computational Integrative Modeling Platform (IMP). The general approach of our method, which was applied to study the 3D conformation of the α -globin domains in the human genome, opens the field for comprehensive studies of the 3D conformation of chromosomal domains in relation to gene expression and contributes to a more complete characterization of genome regulation.

Secuenciación del genoma de SOPE: estrategias para el análisis de genomas ricos en secuencias de inserción.

**Sergio López¹, Luis Delaye^{1,2}, Carmen M. González^{1,3}, Andrés Moya¹, Amparo Latorre¹
y Rosario Gil¹**

¹ICBiBE, Universitat de València (España); ²Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México (México),
³Facultad de Farmacia, Universidad de Granada (España).

La simbiosis es una importante herramienta para la innovación evolutiva cuyos ejemplos son comunes en la naturaleza. Este tipo de relaciones ecológicas es considerada una de las causas del éxito evolutivo de los insectos, muchos de los cuales albergan en el interior de células especializadas (bacteriocitos), bacterias endosimbiontes capaces de suplementar sus dietas habitualmente desequilibradas. La adaptación de tales bacterias a la simbiosis intracelular supone cambios drásticos en la estructura y contenido de sus genomas. Así, tiene lugar un proceso de “degradación genómica” que se ha achacado a una drástica caída de la presión ejercida por la selección natural purificadora y a un incremento del peso relativo de la deriva genética como fuerza de cambio evolutivo, dada la riqueza y estabilidad del medio intracelular y los efectos demográficos del nuevo estilo de vida, respectivamente. Los genomas de estas bacterias se caracterizan, respecto de los de sus parientes de vida libre, por presentar reducidos tamaños, incrementos en el contenido en A+T y total carencia de elementos transponibles funcionales. La mayor parte de dichos cambios se producen en etapas tempranas del proceso adaptativo, luego es preciso estudiar simbiosis de establecimiento reciente con tal de despejar las claves moleculares del mismo. En este contexto, nuestro laboratorio trabaja en la secuenciación y análisis del genoma de SOPE (*Sitophilus oryzae* primary endosymbiont), endosimbionte del gorgojo del arroz desde hace menos de 25MA. Un tamaño genómico en torno a 3Mb, un contenido en G+C del 54% o la abundancia de elementos repetitivos tipo IS son evidencias moleculares al respecto. En este trabajo hemos analizado, a partir de una muestra de los *contigs* disponibles, la dinámica de proliferación de algunos de estos elementos y su relevancia en el proceso de adaptación a la vida intracelular. Nuestros datos sugieren un escenario de proliferación simultánea para algunos de los IS estudiados, apoyando la relevancia de dichos elementos como catalizadores del proceso de remodelación genómica en el que SOPE está inmersa. Además, la abundancia de copias inactivadas de metilasas *dam* entre los *loci* flanqueantes apunta a la posible relevancia de la regulación epigenética en el proceso de adaptación al mutualismo intracelular.

IATSBLAST: Aplicación Web para automatizar e integrar la búsqueda y alineación de intrones de especies de moluscos no secuenciadas contra el portal de la especie *Lottia gigantea*

Oscar Coltell¹, Angel López¹, Carlos Saavedra²

¹Grupo BioInfoGenómica, Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos, Universitat Jaume I, Castellón.

²Instituto de Acuicultura de Torre la Sal-CSIC, Ribera de Cabanes, Castellón.

Introducción. Aunque gracias al Proyecto del Genoma Humano se ha conseguido secuenciar el genoma de muchas especies, todavía quedan muchas por secuenciar. Los investigadores que trabajan con especies no secuenciadas, para identificar y caracterizar las secuencias que obtienen de los especímenes con los que trabajan, deben realizar alineamientos con genomas de especies afines. Sin embargo, eso no siempre es fácil y directo. En el marco de un estudio genómico de la almeja *Ruditapes decussatus*, se plantea la necesidad de identificar intrones a partir de una colección EST. Para ello, es necesario alinear las secuencias de los EST con el genoma recién caracterizado de la lapa *Lottia gigantea*. El genoma de esta especie está accesible a través del portal <http://genome.jgi-psf.org/>. El problema es que el acceso está orientado al usuario y no ofrece una interfaz para acceso programado. Además, para llegar a la secuencia resultado, hay que seguir una serie de pasos en distintas pantallas con el consiguiente tiempo de espera en cada una, sin tener la secuencia resultado alineada. Para esto hay que recurrir a una aplicación de escritorio.

Objetivos. El objetivo principal es diseño y desarrollo de una aplicación Web que automatice e integre la alineación de EST y la búsqueda de intrones de especies de moluscos no secuenciadas contra el portal de la especie *Lottia gigantea*, para obtener la secuencia homóloga de este organismo junto a la secuencia problema. Todo ello integrado en un servidor local del IATS como infraestructura computacional de la aplicación.

Métodos. Para el desarrollo de la aplicación se han utilizado tecnologías de desarrollo de Web estándar, como PHP, JavaScript y un servidor de páginas Web Apache. Todo el software utilizado es Free Software. La aplicación realiza llamadas al BLAST que ofrece el portal de *Lottia gigantea* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Lotgi1&advanced=1>).

Resultados. La herramienta presenta al arrancar una interfaz con ventanas de texto para introducir las secuencias a alinear. En la primera versión de la interfaz se pueden introducir, simplemente pegándolas, hasta cinco cadenas. Cuando se inicia el análisis pulsando el botón "ENVIAR", la aplicación realiza las correspondientes llamadas programadas al BLAST de *Lottia gigantea* y recoge los resultados de la búsqueda sin alinear. Mientras tanto, se pueden hacer otras búsquedas simultáneamente sin esperar a que finalice la búsqueda en curso. Estos resultados los muestra en la misma interfaz debajo de las cadenas introducidas. Se ofrece otra opción por carga de varias secuencias desde un fichero en formato FASTA.

Conclusiones. La aplicación permite obtener las secuencias genómicas de *Lottia* homólogas de los EST de almeja. Se está trabajando en una extensión para poder integrar el alineamiento de las secuencias.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos IATSBLAST EX090247 (IATS-CSIC), COMBIOMED (RD07/0067/0006, ISCIII-FIS, Ministerio de Sanidad), y 200730I023 (CSIC).

Pathway Network Analysis from transcriptomics data

Ignacio Ponzoni², Joaquín Dopazo¹, Ana Conesa¹

¹Bioinformatics and Genomics Department

Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, Valencia

²Laboratory of Research and Development in Scientific Computing (LIDeCC)

Universidad Nacional del Sur – CONICET, Bahía Blanca, Argentina

Systems Biology discipline focus the study of biology as the compendium of molecular systems that operate in an interconnected and coordinated way. The development of high-throughput omics technologies such as DNA microarrays enabled genome-wide measurements of the activity of cellular elements and provides the first analytical resources for the establishment of the Systems Biology orientation. Thus, analysis and interpretation of microarray gene expression data has evolved from the gene to the pathway and interaction level, i.e. from the detection of differentially expressed genes, to the establishment of gene interaction networks and the identification of enriched functional categories. Still, the understanding of the biological systems requires a higher level of study, which would be characterized by the interaction between functional modules. We present a novel methodological approach to data analysis in Systems Biology which enables the definition of networks of relationships between molecular pathways and the study of their changes across experimental situations. The method has been developed for gene expression data.

Our approach relies on the combination of dimensionality reduction methods with machine learning techniques. Given a gene expression experiment and an annotation scheme for genes into pathways, we use PCA to extract, for each pathway a variation signature that compresses and summarizes the gene expression data for the gene members of the pathway¹. Next, we apply adaptive association rules methods based mutual information maximization² to derive relationships between pathway signatures. These relationships can be represented in the form of a network of pathways interactions, where direct and inverse links can be displayed. Finally, we use resampling techniques to give a confidence value for each edge between pathways. We provide the benchmarking of the methodology on the Spellman³ yeast cell-cycle transcriptomics dataset. By using YeastNet⁴ database of gene functional association to demonstrate the functional significance of the network.

Application of the pathway network analysis to the Spellman dataset resulted in a network of 88 Association Rules linking a total of 37 pathways. The network had a compact structure with 3 major modules related basically to metabolism, signaling/transcription and cell_division/nucleic acid repair. Leave-one-out cross-validation values for 75% of the ARs were above 66% and only in a few links had weaker associations. Furthermore, no relationship was found between ARs and pathway size. The yeast cell cycle pathway network had a significant functional association values being 95% of the derived rules were among the top 10% functional association ranking, showing that our network is fully compatible with published functional association data. Furthermore, a better validation of the network was obtained when referencing to the completion of evidence sources compared to the value obtained based on microarray data only. This suggests that our strategy captures cellular functional associations that escape to gene-wise gene expression data analysis methods.

References

1. Conesa et al., 2008. Genomics. 92:373-83.
2. Ponzoni et al. 2007. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform. 4:624-34
3. Spellman et al. 1998. Molecular Biology of the Cell 9, 3273-3297.
4. Lee et al. 2007. PLoS ONE. 2:e988.

Nuevas acciones rápidas del Acido Retinoico en la regulación del procesamiento y la traducción de los mRNAs reveladas a través del análisis proteómico de la fosforilación de proteínas nucleares.

Emilio J. Laserna¹, Salvador Meseguer¹, M. Luz Valero², Libia Sanz¹, Manuel M. Sánchez del Pino², Juan J. Calvete¹ y Domingo Baretino¹

¹*Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), 46010 Valencia.* ²*Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), 46012 Valencia.*

Las acciones del Acido Retinoico (RA), la forma biológicamente activa de la Vitamina A, son mediada por el Receptor de Acido Retinoico (RAR), que pertenece a la superfamilia de Receptores Nucleares de Hormonas. Además de las acciones clásicas a nivel transcripcional, RAR también media acciones rápidas independientes de transcripción (también denominadas acciones no genómicas). Éstas consisten en la activación de rutas de transducción de señal, como la vía de fosfatidil-inositol-3-kinasa (PI3K) o la de las MAP kinasas ERK. Las acciones rápidas inducidas por RA desempeñan importantes papeles en diferentes contextos fisiológicos. Con el objetivo de descifrar las funciones de estas acciones rápidas en la señalización iniciada por RA, hemos identificado las proteínas nucleares cuyo estado de fosforilación es modificado rápidamente por el tratamiento con RA en células de neuroblastoma, empleando un abordaje proteómico. Este abordaje consiste en la purificación de fosfo-proteínas nucleares mediante cromatografía de afinidad a partir de células control y tratadas con RA a diferentes tiempos, y la comparación cuantitativa de los fosfoproteomas nucleares mediante análisis iTRAQ. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con RA induce cambios en el patrón de fosforilación en dos familias de proteínas: (1) proteínas relacionadas con la dinámica de la cromatina en relación con transcripción y (2) proteínas relacionadas con el procesamiento del mRNA y en particular con splicing. Mediante experimentos de transfección que emplean genes reporteros artificiales hemos demostrado que a través de la activación de rutas de señalización el RA conduce a la alteración en la regulación del splicing alternativo de pre-mRNAs y a cambios en la regulación de la traducción de mRNAs en células de neuroblastoma. Experimentos preliminares utilizando microarrays de exones de Affymetrix constatan que el tratamiento con RA afecta a la regulación del splicing alternativo en un número significativo de genes endógenos. Por lo tanto, nuestros resultados revelan nuevas funciones para las acciones independientes de transcripción inducidas por RAR en la regulación del procesamiento de los mRNAs, que forman parte de la respuesta celular a RA orquestada por su receptor nuclear RAR. Los resultados obtenidos contribuyen a la idea de que las acciones transcripcionales y las acciones independientes de transcripción de los receptores nucleares de hormonas están integradas y convergen a múltiples niveles en la regulación de la expresión génica.

Desarrollo de nuevas herramientas proteómicas: etiquetas fluorosas para el marcaje y enriquecimiento selectivo de péptidos

García-Murria, M.J.¹, Valero, M.L.¹, Dionís, E.¹, García Sancho, A.², Fustero, S.², Sánchez del Pino, M.M.¹

Servicio de Proteómica¹ y Laboratorio de Moléculas Orgánicas². Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia.

El empleo de compuestos alquilfluorados en el marcaje de proteínas permite el enriquecimiento selectivo de los péptidos etiquetados de manera sencilla. Además, muestran una excelente ionización por espectrometría de masas y son compatibles con los motores de búsqueda e identificación de péptidos y proteínas. Sin embargo, su aplicación en proteómica es todavía muy reducida.

Presentamos un procedimiento para determinar con precisión los puntos de corte de los fragmentos generados en experimentos de proteólisis parcial mediante marcaje fluoroso de los residuos N-terminales de los mismos. La estrategia incluye un primer paso en el que los grupos ϵ -amino de las lisinas se bloquean selectivamente mediante una reacción de guanidación con O-metilisourea. A continuación los grupos α -aminos terminales se marcan mediante reacción con un éster fluoroso de succinimida (N-Succinimidil 3-perfluorobutilpropionato). El protocolo se ha optimizado tanto para muestras en solución como para muestras procedentes de geles de SDS/PAGE. Hemos observado que los péptidos marcados tienden a ionizarse mejor que los no marcados por lo que no siempre es necesaria una separación posterior. Aun así, estamos optimizando la separación selectiva de los péptidos marcados aprovechando la interacción específica flúor-flúor utilizando sílice fluorosa. La separación se puede llevar a cabo en una microcolumna montada en punta de pipeta o mediante montaje de columna capilar y posterior separación en nanoHPLC. De esta manera se consigue enriquecer la muestra en péptidos marcados en N-terminal.

Además de los ésteres de succinimida, existen otros compuestos fluorosos comerciales para marcar cisteínas o identificar sitios de fosforilación. Estamos desarrollando compuestos entrecruzadores con etiquetas fluorosas, abriendo de esta manera las posibilidades de aplicación de la tecnología fluorosa en proteómica.

Análisis proteómico de las alteraciones en la retina de monos modelo de la enfermedad de Parkinson

Julián Esteve Rudd (1), Laura Campello (1), Roque Bru Martínez (2,4), Carlos Barcia (3), María Trinidad Herrero (3), Nicolás Cuenca (1,4) y José Martín Nieto (1,4)

(1) Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología. (2) Dpto. Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. (3) NiCE-CIBERNED. Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. (4) Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio 'Ramón Margalef'. Universidad de Alicante

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta a un 1-2% de las personas de más de 50 años y que cuenta actualmente en España con más de 100.000 pacientes. Se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra del mesencéfalo y una disminución de los niveles de dopamina en el estriado. No obstante, esta enfermedad también afecta a la estructura y función de la retina. Así, se han descrito en enfermos de Parkinson deficiencias en la sensibilidad absoluta y al contraste, agudeza visual, percepción del movimiento y adaptación a la oscuridad. Estas alteraciones, detectables mediante tests electrofisiológicos y psicofísicos, se han relacionado con la pérdida de neuronas amacrinas dopaminérgicas en la retina de pacientes parkinsonianos y de animales experimentales tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una proneurotoxina que permite reproducir buena parte de la sintomatología del Parkinson. Nuestro grupo ha descrito una serie de alteraciones morfológicas en la retina de macacos tratados con MPTP (Cuenca et al., 2005). Adicionalmente a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, se produce un marcado deterioro de sus neuronas postsinápticas, las amacrinas AII, así como una pérdida de la conectividad sináptica mediada por 'gap junctions' entre estas células, y de sinapsis químicas entre bipolares de bastones y células AII. Hemos concluido, así, que la ruta visual escotópica se encuentra severamente afectada en condiciones de parkinsonismo.

Estos resultados nos han llevado a abordar el estudio de posibles alteraciones en el patrón de expresión de proteínas en la retina neural de monos tratados con MPTP, llevado a cabo mediante DIGE 2D y espectrometría de masas (MS). Para ello, se extrajo la fracción de proteínas solubles de la retina de tres monos sanos y tres monos parkinsonianos, y se marcaron con los fluoróforos Cy3 y Cy5. Tras digitalizar los geles, las manchas proteicas se alinearon y compararon mediante el software bioinformático Progenesis SameSpots. Las proteínas que mostraron diferencias de expresión estadísticamente significativas se aislaron a partir de geles preparativos 2D y se sometieron a digestión con tripsina, seguida de análisis de los péptidos resultantes mediante MALDI-TOF y/o nanoESI-LC/MS. Las huellas peptídicas y espectros de masas obtenidos se utilizaron para el escrutinio de las bases de datos internacionales de polipéptidos NCBI nr y Swiss-Prot mediante los programas MASCOT y Spectrum Mill, con el objeto de identificar las correspondientes proteínas.

Se resolvieron más de 700 manchas proteicas, de entre las cuales 36 mostraban niveles alterados estadísticamente significativos en los monos parkinsonianos con respecto a los individuos control. Dos manchas mostraron un incremento >1,4 veces, y 34 una disminución >1,4 veces, en sus niveles normalizados. De las 36 manchas, se analizaron 29 mediante MS, en las cuales se pudieron identificar 18 proteínas distintas. Entre las que presentaban niveles reducidos en la retina de monos tratados con MPTP, se identificaron proteínas relacionadas con la glucólisis, el metabolismo energético mitocondrial, la fototransducción, el metabolismo del óxido nítrico o el citoesqueleto, así como proteínas secuestradoras de calcio, 'heat-shock', antiapoptóticas y citoprotectoras. Las manchas proteicas con niveles incrementados en los monos parkinsonianos correspondían a la nucleósido difosfato quinasa B y a la β -cristalina B2. Esta última se piensa que está relacionada con la elongación axonal asociada a la regeneración neuronal que tiene lugar como respuesta a daño, en este caso el tratamiento con MPTP.

Nuestros resultados sugieren que en la degeneración de la retina inducida por MPTP participan mecanismos similares a los relacionados con la etiología del Parkinson y de otras enfermedades neurodegenerativas retinianas, tales como la retinosis pigmentaria. En efecto, se ha detectado daño mitocondrial, desregulación de los niveles de Ca^{2+} citosólico, disfunción del sistema de chaperonas y/o alteraciones en rutas de transducción de señales en procesos neurodegenerativos que afectan tanto al cerebro como a la retina, así como durante el envejecimiento normal. Asimismo, también podría existir una respuesta celular al daño inducido por MPTP mediante la producción de factores promotores del crecimiento axonal.

Cuenca N, Herrero M-T, Angulo A, De Juan E, Martínez-Navarrete GC, López S, Barcia C and Martín-Nieto J (2005) J. Comp. Neurol. 493: 261-273.

Financiación: MEC (BFU2006-00957/BFI), MSyC (RETICS RD07/0062/0012), ONCE y FUNDALUCE.

Agradecimientos: Servicio de Proteómica de la Universidad de Alicante (integrado en ProteoRed).

Applications and current challenges of proteomic approaches on differential proteomics

**Valero, M.L.¹, Cantero, L.¹, Dionís, E.¹, Rejas, V.¹, Tenorio-Laranga, J.², García-Horsman J.A.²,
Sánchez del Pino, M.M.¹**

1) Servicio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia.

2) Division of Pharmacology and Toxicology, University of Helsinki, Finland

The quantification of differences between two or more physiological states of a biological system is among the most important but also most challenging technical tasks in proteomics.

Classical methods perform an initial separation step at the protein level, usually a high resolution 2D electrophoresis, where quantitation takes place. A major limitation of the technique is that mainly soluble abundant proteins are separated and detected. A second step is needed to identify the proteins of interest. Over the past few years, mass spectrometry-based quantification methods have gained increasing popularity. Most of de mass spectrometry-based methods employ differential labeling with stable isotopes to create a specific mass tag that can be recognized by a mass spectrometer and provide the basis for quantification.

The optimal strategy to perform quantitative proteomic analyses to obtain the most informative data sets is undefined and it, probably, depends on the systems under study. Over the past five years the proteomics core facility at Centro de Investigación Principe Felipe has been performing DIGE and iTRAQ experiments. We present some of the most challenging quantitative studies carried out in our facility, applied to the discovery of new bladder cancer biomarkers or in vivo substrates for Prolyl oligopeptidase, as examples of the application of the different methodological strategies.

iTRAQ-based proteomic dissection of grape berry exocarp during ripening

Maria José Martínez-Esteso¹, Susana Sellés-Marchart¹, Maria Teresa Vilella Antón¹, Juan Casado-Vela², Félix Elortza², Maria Angeles Pedreño-García³ and Roque Bru-Martinez¹

¹Grupo Proteómica y Genómica Funcional de Plantas Departamento Agroquímica y Bioquímica. IMEM Ramon Margalef. Universidad de Alicante ²CIC-Biogune, Parque Tecnológico de Vizcaya ³Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Murcia

Grapevine (*Vitis vinifera*) is one of the economically most important fruit crops. The berry components that compose the final quality traits of both table and wine grapes, such as sugars, acids, flavours, anthocyanins, tannins, etc., are synthesized or accumulated along the different grape berry development stages. The exocarp is responsible for traits such as colour, astringency and flavour, of paramount relevance in grape and wine industry. Proteomic profiles along the development are expected to correlate with the biochemical and physiological changes known to occur in the grape berry exocarp. The grape berry development has been characterized to some extent at biochemical and molecular levels, and semi-quantitative proteomic approaches have been undertaken to better characterize and understand this biological process of agro-economical relevance. We have taken advantage of iTRAQ and exact mass and high resolution power of Linear Ion Trap-Orbitrap platform to quantify both large and subtle changes in proteins along the grape berry exocarp development. Low (CID) and high (HCD) energy fragmentation of parental ions was carried out to obtain information on peptide sequence and reporter ion abundance, respectively. A suite of bioinformatic and statistical tools, including Spectrum Mill Proteomics Workbench and Blast2GO were used to identify and quantify proteins, group proteins into abundance patterns, to rank proteins according to abundance levels and to determine the ontologies associated to each cluster and each developmental stage. Results correlate quite well with known physiological, biochemical and molecular changes, thus giving a proof of concept of our proteomic analysis. Then new proteins not previously associated to grape berry exocarp developmental stages could be described.

Acknowledgements: Genoma España-GRAPEGEN grant. Genoma España-PROTEORED

Sesión III: Servicios y Redes de Genómica o Proteómica.

Avances en el análisis multigénico

Serna E, Portero J.M, Pallardó F.

Unidad Central de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

La tecnología de Microarrays, basada en la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos, puesto a punto por la compañía Affymetrix, permite el análisis del genoma.

Los microarrays de Affymetrix se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos de 25-mer utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo.

Las muestras de RNA se marcan con biotina y cada muestra se hibrida en un array independiente.

Existen distintos Genechip específicos para cada genoma y según el objetivo del estudio destacamos:

- 3' Expression arrays, 11 sondas/gen que hibridan con la región 3' del transcrito. Para el análisis convencional de patrones de expresión basado en secuencias predichas y bien anotadas en la base de datos.
- Gene array, 26 sondas/gen diseñadas a lo largo del gen completo. Para estudios de expresión diferencial más completos.
- Exon array, 4 sondas/exon y 40 sondas/gen. Para estudio de niveles de expresión génica y exónica.
- Tiling arrays (Whole-genome array) que cubren todo el genoma y pueden ser empleados para estudios de mapeo transcripcional y de interacciones proteína/DNA a nivel genómico (ChIPonChip).
- miRNA array, miRNA de más de 70 organismos distintos, y snoRNA y scaRNA de humanos.

La Unidad Central de Investigación dispone de un servicio centrado en esta tecnología de microarrays que constituye una herramienta fundamental en las investigaciones genómicas. Este servicio cuenta con la plataforma necesaria para la realización de cualquier estudio de organismos biológicos relevantes, tanto de animales como vegetales. Además, Affymetrix permite la posibilidad de diseñar tu propio microarray con los parámetros y las secuencias que se desee.

Proteómica nacional: La SEProt, el grupo de Genómica y Proteómica de la SEBBM y ProteoRed

Juan J. Calvete

Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC. jcalvete@ibv.csic.es

La Proteómica española va camino de abandonar la niñez y entrar acelerada-, pero decididamente, en su madurez.

El pasado trece de Abril (Acta Fundacional) o nueve de Diciembre (Registro de Asociaciones) la Sociedad Española de Proteómica (SEProt, <http://www2.cbm.uam.es/seprot>) cumplió sus primeros 5 años de existencia. Los sucesivos congresos bienales han consolidado la decidida vocación internacionalista de la SEProt, tanto en el plano europeo -contribuyendo actualmente de manera destacada en los órganos de dirección y comités de la Federación Europea de Sociedades de Proteómica (EuPA, <http://www.eupa.org>)- como en el ámbito latinoamericano. En el plano nacional, la SEProt organiza diversos cursos de formación, edita la revista PROTEÓMICA, y organiza unas Jornadas Bienales de Proteómica para Jóvenes Investigadores los años alternos a los Congresos. Las características de esta reunión responden a sus objetivos: fomentar la participación del mayor número de socios, especialmente los más jóvenes y crear un foro de discusión que contemple tanto aspectos científicos como prácticos. Tras el éxito de participación y la calidad científica alcanzada en las I Jornadas celebradas en Barcelona en 2008, las II Jornadas tendrán lugar durante los días 11 y 12 de Febrero de 2010 en el Rectorado de la Universidad de Córdoba, emblemático edificio neomudéjar situado en el centro de la ciudad. El programa científico provisional puede encontrarse en el portal de la SEProt. Por su parte, el grupo Genómica y Proteómica de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM, <http://www.sebbm.es>) promueve la difusión de los últimos avances tecnológicos en genómica y proteómica así como sus aplicaciones a proyectos de investigación. Anualmente, en el marco del Congreso de la SEBBM, se celebra la reunión del grupo en la que se presentan y discuten los últimos avances en estas disciplinas. Durante el pasado congreso en Oviedo, los coordinadores Fernando Corrales (CIMA, Universidad de Navarra, actual Presidente de la SEProt) y José E. Pérez Ortín (Universidad de Valencia) nos dieron el relevo a Esteban Ballestar (IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, eballestar@idibell.org) y a mí.

Otra iniciativa, patrocinada desde el año 2005 por Genoma España (<http://www.gen-es.org>) es ProteoRed (<http://www.proteored.org>). Aunque (mal) denominado como *Instituto Nacional de Proteómica*, ProteoRed es un consorcio de 17 (+ 2 asociados) Servicios de Proteómica cuyo objetivo primordial constituyente es la estandarización de protocolos como soporte a la investigación proteómica. Asimismo, ProteoRed promueve cursos de formación y participa en diversas actividades de HUPO (Human Proteome Organization, <http://www.hupo.org>), EuPA, y ABRF (Association of Biomolecular Resource Facilities, <http://www.abrf.org>). Durante sus años de existencia, la filosofía y funcionamiento de ProteoRed han sido elogiados por las organizaciones mencionadas, pero el próximo año, al vencer este proyecto inicialmente financiado a 5 años, ProteoRed podría desaparecer. ¿Puede la joven Proteómica española permitirse este recorte...?

SPLICING ALTERNATIVO EN LA REGIÓN DE CLASE III DEL MHC

O Villate, A Rastrojo, R López-Díez, F Hernández-Torres y Begoña Aguado

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO) (CSIC-UAM), Campus Cantoblanco, 28049 Madrid

Actualmente conocemos la secuencia del genoma de varias especies y podemos observar que el número y diferencias de genes que contienen no se correlacionan con su complejidad y diversidad. La variación a nivel de secuencia genómica es menor que la variación transcriptómica entre las diferentes especies. En este contexto el splicing alternativo surge como uno de los mecanismos capaces de explicar estas aparentes contradicciones. No hay muchos estudios comparativos detallados que analicen en profundidad el splicing alternativo en distintas especies y/o tejidos, y por ello, aún desconocemos cómo realmente éste ha podido influir en estas diferencias.

El splicing alternativo es un proceso que posibilita la generación de varios transcritos diferentes a partir de un único locus génico que pueden ser traducidos o no, produciendo proteínas distintas o RNAs no codificantes (ncRNAs) con posibles papales reguladores, incrementando así la diversidad del proteoma y transcriptoma a partir de un mismo genoma o de genomas parecidos. Alteraciones en este mecanismo pueden dar lugar a enfermedades, conociéndose cada vez más patologías producidas por cambios en la expresión de isoformas de RNA.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) humano se ha descrito como la región más importante del genoma de vertebrados en cuanto a genes implicados en infección, auto-inmunidad y en genes relacionados con la respuesta inmune tanto innata como adaptada. En el laboratorio trabajamos describiendo genes del MHC de clase III, la región más densa de genes del genoma humano. Hemos encontrado genes, como es el caso de *LY6G5B* y *LY6G6D* que presentan splicing alternativo produciendo RNAs codificantes y no-codificantes (los cuales se expresan mayoritariamente), así como RNAs quimeras con genes adyacentes o cercanos, todos ellos presentando expresión diferencial en tejidos y organismos. Datos preliminares del laboratorio nos han indicado en sangre de pacientes con artritis reumatoide un aumento de la expresión de las isoformas del gen *NFKBIL1* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1) y más en concreto de una de sus isoformas (*NFKBIL1V3*). Hemos caracterizado las diferentes formas de splicing alternativo presentes en el gen *RAGE* (*Receptor for advanced glycosilation end products*) en humano, llegando a encontrar más de 30 isoformas. Así mismo, se ha realizado un estudio comparativo de las isoformas de *RAGE* con otros mamíferos, incluyendo primates (*Macaca mulatta*), ungulados (*Bos taurus* y *Sus scrofa*) y roedores (*Mus musculus* y *Rattus norvegicus*), encontrándose diferencias de expresión en cuanto a especie, tejido y estadios de desarrollo. El gen *NCR3* es uno de los tres miembros de la familia NCR (Natural cytotoxicity receptor). En muestras humanas, hemos sido capaces de detectar para *NCR* nueve transcritos diferentes, tres de ellos no-codificantes. Los seis codificantes darían lugar a proteínas diferentes, con dominio Ig extracelular variable o constante combinados con tres dominios citoplasmáticos diferentes, lo que podría influir en la unión al ligando y en la señal intracelular. En otros mamíferos estas isoformas no están conservadas, apareciendo otras nuevas.

Basados en nuestras observaciones concluimos que es siempre necesario llevar a cabo estudios detallados que analicen en profundidad todos las proteínas codificadas por RNAs procedentes de isoformas de splicing generados por un mismo gen en diferentes especies y tejidos, así como de todas las isoformas de RNAs no-codificantes (ncRNAs), para ayudar a entender cómo influye el splicing alternativo en la flexibilidad génica, la complejidad del transcriptoma y del proteoma, así como la diversidad entre especies y el desarrollo de patologías.

Genome-wide analysis of Oligodendroglial Tumours.
Merging Genomic, Transcriptomic and Metabolomic Data.
eTUMOUR FP6-2002-LSH 503094

R. Ferrer-Luna¹, H. Martinetto², M. Mata³, J. Calvar², E. Serna⁴, JM. Morales⁴, E. Buso⁴, G. Sevlever² and B. Celda^{1,5}.

1-. Department of Physical-Chemistry. Universitat de Valencia. Spain.

2-. Neuropathology Service. FLENI. Buenos Aires. Argentina.

3-. Research Foundation. Hospital General Universitario de Valencia. Spain

4-. UCIM. Universitat de Valencia. Spain..

5-. CIBER-BBN. ISC-III. Valencia. Spain.

Introduction.

The new challenge in the post-genomic era is to integrate genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic data. This merge of “omic” data set, also known as “system biology” could help us to understand cancer biology and get a more realistic knowledge of the pathological process. It has been observed that Oligodendrogliomas (OT) are one of the most chemosensitive solid tumours and loss of chromosome (LOH) 1p was tightly associated with chemotherapy response^[1]. The purpose of this study was obtain a comprehensive genomic analysis of DNA copy number, methylation, gene expression, and “ex vivo” and “in vivo” metabolic profiles in 29 OT patients.

Methods.

High density 100k_SNP arrays were used to detect allelic imbalances and copy number alteration^[2]. *EGFR*, *CDKN2A* and 1p, 19q, 10q status were validated by RT-PCR analysis. *TP53* mutations were confirmed by sequencing. Genes more differentially expressed among groups were selected and evaluated by PCA, Hierarchical_Clustering and Functional_Enrichment was determined^[3]. Genes markers identified in our transcriptomic analysis were assessed by quantitative RT-PCR. Methylation status was determined by base specific cleavage and mass spectrometry^[4]. “In vivo” and “ex vivo” NMR metabolic profiles were done according eTUMOR protocols^[5,6].

Results and Conclusions.

Three main groups of OT were detected^[7]. “Proneural” group integrated by samples showing 1p/19q LOH, over-expresses genes related with neurogenesis and showed *MGMT* hypermethylation. This molecular group had good overall survival in treated patients. Tumours harbouring 1p/19q LOH over-express genes linked to immune response/inflammation and proliferation. This group could in turn be further divided in two genetic subtypes, “Intermediate_phenotype” which didn’t show major genetic aberrations other than LOH and mutation at *TP53*, and *GSTP1* hypermethylation in almost all samples. Finally “Proliferative” group concentrated samples carrying several anomalies: LOH at 10q, *EGFR* amplifications, *MGMT* and *GSTP1* hypomethylation in most samples. Worst prognosis, and molecular features resembling GBM were displayed. *CDKN2A* inactivation was a common success in all samples, hypermethylation was more frequent in indolent tumour and by contrast, deletion was higher in “proliferative” group. *NOTCH2* located at 1p and *BMP2* were differentially expressed; they are two key partners in neuronal differentiation and instruct glial differentiation. *NOTCH2* haploinsufficiency could be critical. OT with worst prognosis “Proliferative”, presented increased levels of Choline_Compounds, Fatty_acids, Alanine and Glutathione when were compared with *Proneural* group in “ex vivo” spectra. “In vivo” metabolic profiles didn’t reach differences among molecular groups, due lower spectra resolution.

Each tumour is singular but detected alterations could reveal the divergent response showed by these molecular subgroups in survival and chemotherapy treatment. Molecular predictors might be complementary to pathological diagnosis. By now, we are moving forward the first steps towards brain cancer system biology, being the ultimate goal to get an automated approach to analyze n-dimensional data set and their interactions.

References.

- 1-. Cairncross G. et al.(1998). *J.National Cancer Institute*.
- 2-. Beroukhi R et al. (2006). *Plos Computational Biology*.
- 3-. Al-Shahrour F., et al. (2004). *Bioinformatics*.
- 4-. Ehrlich M. et al.(2005). *PNAS*.
- 5-. Celda B. et al. (2006). *Adv Exp Med Biol*.
- 6-. www.etumour.net;
- 7-. Ferrer-Luna R. et al. (2009). *J. Neurooncol*.

Acknowledgements.

Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España (SAF2007-6547) and European project: eTUMOUR (contract no. FP6-2002-LIFESCIHEALTH 503094).

Estudio de la expresión de micro-RNAs en la diferenciación celular inducida por Acido Retinoico en células de Neuroblastoma.

Salvador Meseguer^{1,2}, Giridhar Mudduluru², Heike Allgayer², Domingo Baretino¹

¹Unidad de Biología de la Acción Hormonal. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Valencia (España).

²Dept. of Experimental Surgery/Molecular Oncology of Solid Tumors (Collaborative Unit DKFZ-Heidelberg), Medical Faculty Mannheim, Ruprecht-Karls-University Heidelberg, Mannheim (Alemania).

Los micro-RNAs (miRNAs) son una nueva clase de RNAs no codificantes de pequeño tamaño que actúan fundamentalmente en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, y se han revelado como importantes reguladores de diversos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos, como el desarrollo embrionario, la apoptosis, la diferenciación celular, la tumorigénesis, la progresión tumoral, etc. Hemos estudiado el papel de los miRNAs en la diferenciación celular inducida por Acido Retinoico (RA) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Mediante Arrays de Baja Densidad para RT-PCR cuantitativa hemos analizado los perfiles de expresión de 657 miRNAs humanos en células SH-SY5Y tras diferentes tiempos de tratamiento con RA. Hemos podido detectar la expresión de 452 miRNA distintos, mientras que la expresión de otros 215 miRNAs no pudo ser detectada. Entre los miRNAs expresados, 20 son regulados positivamente y 19 regulados negativamente por el tratamiento con RA, mientras otros 413 no alteran significativamente su patrón de expresión por efecto del RA.

Hemos centrado nuestro estudio en los miRNAs hsa-miR-10a y hsa-miR-10b, cuya expresión se incrementa fuertemente (cerca de 8 veces) por efecto de RA. El bloqueo de los miR-10a y 10b, con sus correspondientes RNAs antisentido (AntimiRs) inhibe la diferenciación morfológica inducida por RA en las células SH-SY5Y. El tratamiento con RA reduce la expresión de los genes ID1, ID2 e ID3, importantes reguladores negativos de la diferenciación que pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales bHLH. El bloqueo de los hsa-miR10a y 10b con sus correspondientes AntimiRs evita la regulación negativa de los genes IDs, lo que implica a estos miRNAs en la regulación negativa de estos factores mediada por RA.

La predicción mediante métodos bioinformáticos de posibles dianas de la acción de lo hsa-miR-10a y 10b indica que los factores de splicing de la familia SR SFRS1 y SFRS10 podrían ser sujetos de la regulación por estos miRNAs. En los 3' no traducidos de los mRNAs de SFRS1 y SFRS10 se encuentran secuencias complementarias a las de hsa-miR-10a y 10b, que además están conservadas evolutivamente. En diferentes líneas celulares se observa una relación inversamente proporcional entre los niveles de hsa-miR-10a y 10b y los niveles de la proteína SFRS1. En experimentos de co-transfección con genes reporteros en los que la región codificante del gen de la luciferasa se fusiona al 3'UTR de SFRS1 y SFRS10, se puede observar la regulación positiva de su traducción por AntimiRs 10a y 10b, y la regulación negativa por precursores (pre-miRs) de los hsa-miR-10a y 10b. El nivel de la proteína SFRS1 en células SH-SY5Y se incrementa inicialmente con el tratamiento con RA, para descender por debajo de su valor basal a las 96 horas de tratamiento, cuando los niveles de hsa-miR-10a y 10b alcanzan su máximo. En estas condiciones la co-transfección de los AntimiR-10a y 10b evita esta regulación negativa, y se observa un incremento de los niveles de SFRS1 incluso por encima de los niveles basales previos al tratamiento con RA. Los resultados indican la implicación de hsa-miR-10a y 10b en la regulación de estos importantes factores de splicing de la familia SR.

Caracterización por secuenciación 454 de transcriptomas de la glándula del veneno de serpientes centroamericanas

Paula Juárez¹, Jordi Durban^{1,2}, Ana Conesa² & Juan J. Calvete¹

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

² Departamento de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, Avda. Autopista Saler 16, 46012 Valencia.

Por sus características ecológicas y biogeográficas, Centroamérica posee una rica fauna de reptiles, que incluye 34 especies de serpientes (la mayoría de la familia Viperidae) venenosas. El envenenamiento por mordedura de serpiente constituye un importante problema de salud pública en la región centroamericana, con más de 4000 casos anuales. El estudio de los componentes del veneno (venómica) ha aportado datos sobre el número y distribución de las familias de proteínas presentes en las diferentes especies de serpientes, pero todavía se sabe poco sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las toxinas. Para ello es necesario un estudio más completo de los mensajeros presentes en el aparato secretor del veneno. En el presente trabajo estudiamos la actividad transcripcional de las glándulas de veneno y establecemos una estrategia útil para el estudio de organismos no modelo, es decir, organismos cuyo genoma no ha sido secuenciado, para el cual la nomenclatura no ha sido suficientemente desarrollada y, consecuentemente, la redundancia en las bases de datos es muy alta. Para ello, en lugar del clásico estudio del transcriptoma por ESTs (Expressed Sequence Tags) hemos utilizado la tecnología de secuenciación 454 (FLX System, Roche Applied Science). Cada uno de los 8 cDNAs obtenidos de las glándulas de *Bothriechis lateralis*, *Bothriechis schlegelii*, *Atropoides nummifer*, *Atropoides picadoi*, *Crotalus durissus*, *Cerrophidium godmani*, *Bothrops asper* atlántica y *B. asper* pacífica. fue etiquetado, fraccionado por nebulización, pulido (extremos romos) y ligado con los adaptadores que permitieron la posterior reacción de amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería. Dada la baja cobertura del proceso de secuenciación (el número medio de lecturas por contig fue de 4), y la falta de disponibilidad del genoma correspondiente, se optó por desarrollar una estrategia *ad hoc* para este tipo de datos (transcriptómica de especies no modelo) basada en el ensamblaje de los mensajeros por homología con secuencias de proteínas de especies representadas en el banco de datos. Así, realizamos un blastn contra la base de datos no redundante de NCBI en un servidor local, y se identificaron los "best-hits" correspondientes a serpientes. Los descriptores de estos best-hits fueron analizados y agrupados en 12 familias de toxinas principales. Se generaron clusters de lecturas y best-hits correspondientes a cada familia proteica, que se ensamblaron independientemente. En cada ensamblaje, la secuencia aminoacídica de la especie más cercana evolutivamente a nuestros organismos fue utilizada como molde para el alineamiento de los hits generándose así consensos mixtos que combinan las regiones secuenciadas en nuestras serpientes con regiones intermedias identificadas únicamente en la secuencia de referencia. El número de lecturas correspondiente a cada familia de toxinas en cada especie fue calculado, generándose un perfil de abundancias relativas de las diferentes familias de toxinas en las 8 serpientes. Este perfil de expresión nos permitió agrupar las diferentes serpientes en grupos de parentesco. Finalmente se realizó un estudio de la heterogeneidad de cada familia génica en cada una de las serpientes. Nuestro estudio representa una forma de profundizar en el conocimiento de la complejidad de la composición del veneno de las 7 especies de serpientes investigadas. Estos datos son de gran relevancia para comprender mejor la evolución de los venenos. Asimismo, una comprensión detallada de la composición proteica de los venenos es relevante para poder diseñar mezclas de inmunización con las que generar antivenenos de amplio espectro que ayuden a paliar el envenenamiento por mordedura de serpiente, una patología preocupantemente descuidada en muchas regiones de nuestro planeta.

Pósters

Póster nº 1

Servicio de Genómica del CBM-SO (CSIC-UAM)

Fernando Carrasco, Laura Tabera, Sandra Gonzalo, Begoña Aguado

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO), Cantoblanco, 28049 Madrid

Este Servicio pertenece al Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBM-SO), que es un centro mixto constituido por el Instituto de Biología Molecular “Eladio Viñuela” (CSIC) y el Instituto de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Fue creado en 2004 para dar servicio a la creciente demanda en nuevas tecnologías en el campo de la genómica, transcriptómica y biología molecular en general.

Se responsabiliza del desarrollo tecnológico en las áreas mencionadas, diseña, realiza y analiza experimentos de PCR y RT-PCR en tiempo real para los usuarios que lo demanden, proporciona asesoramiento técnico y científico a los usuarios y vela por el correcto mantenimiento de los equipos. Se trata de un servicio con un modelo de funcionamiento abierto, en el que el usuario puede seleccionar su grado de implicación según sus necesidades: desde aquellos que buscan la formación y el soporte necesarios para utilizar el equipamiento de forma independiente hasta los que solicitan la planificación, ejecución y análisis de experimentos completos por parte del personal del servicio. Este modelo cuenta con un elevado grado de aceptación por parte de los usuarios tanto internos como externos al centro.

El equipamiento disponible en el servicio incluye espectrofotómetros Nanodrop, bioanalizador Agilent 2100, termocicladores convencionales, termocicladores de tiempo real Lightcycler 1.0 y ABI7900HT y PC portátil con licencias de los software Pathway Studio y Medscan Reader. Recientemente hemos incorporado también un extractor automático de ácido nucleicos Maxwell 16 de Promega y próximamente se va a adquirir una estación de manejo automático de líquidos Eppendorf 5075 que mejorará la reproducibilidad y la productividad en los experimentos de PCR y RT-PCR en tiempo real.

El área de especialización principal del Servicio de Genómica del CBM-SO es la tecnología de PCR en tiempo real, un método basado en la continua monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. La aplicación principal de esta metodología en nuestro Centro es el estudio y comparación de la expresión génica de los sistemas biológicos. En este apartado la técnica es actualmente aceptada por la comunidad científica como el “gold standard” por su amplísimo rango cuantitativo y su capacidad de resolución, ambos muy superiores a los de las micromatrices o chips de DNA. Por ello, es la técnica habitualmente empleada para validar resultados obtenidos en los chips mencionados. Otras de las numerosas aplicaciones posibles con esta técnica son la verificación del noqueo temporal de genes en experimentos con RNA interferente (RNAi), la detección de microorganismos en muestras biológicas y el genotipado.

En cumplimiento de su papel como motor del desarrollo tecnológico en el CBM-SO, en la actualidad este Servicio está liderando una iniciativa conjunta con otros dos centros del CSIC (CNB e IIB) y el Parque Científico de Madrid (PCM), y ha conseguido financiación para la implementación en 2010 de una Plataforma de Secuenciación Masiva que prestará servicio a usuarios internos y externos.

El personal del Servicio está altamente especializado y en permanente actualización mediante la asistencia a cursos y congresos de carácter internacional. En estos últimos ha presentado, además, varios trabajos en colaboración con usuarios del Servicio.

Otra de las funciones del Servicio de Genómica es la de organizar seminarios y cursos de carácter técnico-científico en las áreas citadas anteriormente, con la participación de empresas e instituciones tanto españolas como de ámbito internacional.

La información acerca del Servicio es fácilmente accesible a través de la página web del mismo, dentro del marco que ofrece la página institucional del centro. Una de las principales funciones de esta web es la de facilitar a los usuarios la reserva electrónica de los distintos equipamientos del Servicio.

http://www2.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio.aspx?IdServicio=32

Analysis of gene expression during the fruit set of tomato.

Laura Pascual, Jose M. Blanca, Joaquin Cañizares and Fernando Nuez

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain
(E-mail: jcanizares@upvnet.upv.es)

The study of tomato fruit set and early fruit development is of up most importance due to their economic implications for crop production. Fruit development is also a process of interest for the study of plant development regulation, and the tomato has been used as a model plant for climacteric fruit development. Fruit development in tomato is divided in four phases: fruit set, cell division stage, cell expansion stage and ripening. In tomato, the fruit set can be defined as the restarting of cell division in the ovary after pollination or fecundation. The development of tomato fruit is independent of embryo development, and the linkage of these processes can be broken. Parthenocarpy, the production of fruits without seeds, is common in this species and can be caused by natural mutations, environmental factors or hormone treatments. In this work, we isolated more than four hundred genes that are differentially expressed during tomato fruit set by using two complementary approaches: suppressive subtractive hybridization (SSH) and genomic comparative analysis. We also detected a high degree of conservation in the expression between *Arabidopsis* and tomato, in spite of the clear differences between the fruits of these species. This conservation between *Arabidopsis* and tomato proves that this orthologue approach can be useful in other biological processes or species, as it is a quick system for identifying candidate genes in species where there are no available microarray facilities. Analysis of the transcriptome of parthenocarpic and non-parthenocarpic tomato lines are in development to identify more pathways and genes implicated in the parthenocarpy in tomato.

***Crotalus durissus collilineatus* Venom Gland Transcriptome: Analysis of Gene Expression Profile**

Boldrini-França, J.^a; Rodrigues, R. S.^a; Fonseca, F. P. P.^b; Otaviano, A. R.^a; Silva, F. H.^b; Soares, A. M.^c; Hamaguchi, A.^a; Rodrigues, V. M.^a; Homsí-Brandeburgo, M. I.^a

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia-MG, Brasil;

^bDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos-SP, Brasil;

^cDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Abstract. *Crotalus d. collilineatus* is related to a great number of accidents in Southeast and Central west regions of Brazil, but few studies on its venom composition have been carried out. In an attempt to describe the transcriptional profile of the *C. d. collilineatus* venom gland, we generated a cDNA library and sequences obtained could be identified by similarity searches on existing databases. 489 out of 673 expressed sequence tags (ESTs) produced readable sequences comprising 201 singletons and 47 clusters. 115 reads (60.5%) produced significant hits to known sequences. The results showed a predominance of toxin-coding ESTs instead of transcripts coding for proteins involved in all cellular functions. The most frequent toxin was crotoxin, comprising 88% of toxin-coding sequences. The crotoxin B, a basic phospholipase A₂ (PLA₂) subunit of crotoxin, was represented in more variable forms comparing to the non-enzymatic subunit (crotoxin A). 2% of toxin-related sequences in this study were identified as Growth Factors, comprising five sequences for vascular endothelial growth factor (VEGF) and one for nerve growth factor (NGF) that showed 100% of identity with *C. d. terrificus* NGF. We also identified two clusters for metalloprotease from PII class comprising 3% of toxins, and two for serine proteases, including gyroxin (2.5%). The remaining 2.5% of toxin-coding ESTs represents singletons identified as cardiotoxin, convulxin, angiotensin converting enzyme inhibitor and C-type natriuretic peptide, Ohanin, crotoxin and PLA₂ inhibitor. These results allowed identification of the most common classes of snake venom toxins; however, some of them were unknown for *C. durissus collilineatus* subspecies, and even for *Crotalus durissus* specie, such as cardiotoxins and VEGF.

Financial support: FAPEMIG, FAPESP, CNPq and CAPES

DETECTION OF H3C comb. HAPLOTYPE rDNA ITS1-ITS2 OF *Galba truncatula* (GASTROPODA, LYMNAEIDAE) AND ITS POTENTIAL IMPACT ON FASCIOLIASIS TRANSMISSION IN ARGENTINA

ARTIGAS P.¹; R.L. MERA Y SIERRA^{1,2}; M. KHOUBBANE¹; S. MAS-COMA¹; M.D. BARGUES¹

¹ Departamento de Parasitología, Universidad de Valencia, Av. V.A. Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. (Patricio.Artigas@uv.es)

² Fac. Cs Médicas, U. Nacional de Cuyo Av. Libertador 80 C. Universitario, P.O. Box 33,5500 Mendoza, Argentina

INTRODUCTION

Human fascioliasis has recently entered in the list of the most important parasitic diseases of man. The human endemic areas presenting the highest prevalences and intensities are found in Andean countries as Bolivia and Perú, where the disease is transmitted by the molluscan gastropod of the Lymnaeidae family *Galba truncatula*¹. The finding and determination of this vector species in Argentina in 2001 were initially based on morphology². More recent studies have demonstrated that morphology does not enable to distinguish between species of the *Galba/Fossaria* group^{3,4}. The aim of this paper is to confirm the presence, in Argentina, of the best fascioliasis vector known by means of specific DNA ITS1 and ITS2 rDNA sequencing.

MATERIAL AND METHODS

Molluscs were collected in El Salto, on the Andean zone of Mendoza, Argentina, and fixed with ethanol 70%. Total DNA ($n=5$) was extracted, amplified and purified following standard methods. The sequence of the nuclear ribosomal DNA ITS1 and ITS2 was obtained by means of an automatic sequencer using specific primers. The BLAST programme was used for the fast comparison with all sequences of lymnaeids available at GenBank. The final comparison was made by alignment using Clustal W version 1.8.

RESULTS

The complete sequence of the ITS-1/ITS-2 rDNA presented the same length of 504/401 base pairs and a GC content of 57.5/58.6% sc. The Argentinean lymnaeids presented an ITS-1 sequence showing a 99.6% similitude and an ITS-2 97% similitude with the *G. truncatula* haplotype A (HA) and H1 from Europe. The sequence obtained was identical in length, contents and composition of nucleotides than the haplotype HC (ITS-1) and H3 (ITS-2) of *G. truncatula*, previously described in Bolivia¹ (GenBank Acc. No. AJ272052 / AJ272051).

DISCUSSION

The finding in Mendoza of the same haplotype H3C comb. of the molluscan vector responsible of the human and animal fascioliasis on the Northern Bolivian Altiplano, the most important human endemic area⁵⁻⁷, is a fact of great interest because of its large potential impact on public health, owing to the aspects of great transmission capacity which are present on the Andean zone of Mendoza. All suggests the need to perform a large future study to establish the geographical distribution of *G. truncatula* H3C in Argentina. The ITS-2⁸ appears to be the most useful, specific, sensible and practical molecular tool for such future studies.

REFERENCES

1. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Parasitology* 2001; 123:S115-S127.
2. Mera y Sierra RL. Tesis de Maestría, MIEPT. Depto. Parasitología, U. Valencia, 22.06.2001:1-46.
3. Artigas P, Mera y Sierra RL, Correa AP, Morales JR, Zuriaga MA, Jiménez M, Khoubbane M, Bargues MD, Mas-Coma S. *Acta Parasitol Port* 2005; 12(1-2):243-4.
4. Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier- Brook C, Mas-Coma S. *Inf Gen Evol* 2001; 1(2):85-107.
5. Bargues MD, Mera y Sierra RL, Gómez H, Artigas P, Mas-Coma S. *Anim Biodivers Conserv* 2006; 29(2):191-194.
6. Bargues MD, Mera y Sierra RL, Gómez H, Artigas P, Mas-Coma S. *Enf Emerg* 2007; 9(2): 77-82.
7. Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, Strauss W. *Trop Med Int Health* 1999; 4(6):454-67.
8. Bargues MD, Mas-Coma S. *Mol Biol Evol* 1997; 14(5):569-77.

Studies funded by Projects Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Proyectos Nos. C03/04, ISCIII2005-PI050574 and ISCIII-RETIC RD06/0021/0017, Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa), FIS, Ministerio de Sanidad, Madrid, and Projects No. BOS2002-01978 and No. SAF2006-09278 Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid. Studies in Argentina funded by Universidad Nacional de Cuyo.

NUCLEAR RIBOSOMAL DNA ITS-2 SEQUENCE CHARACTERIZATION OF *Fasciola hepatica* AND *Galba truncatula* IN NATURAL INFECTION IN GILAN PROVINCE, IRAN

Artigas P.¹, K. Ashrafi², J. Massoud², K. Holakouie Naieni³, M. Mahmoodi³, M.A. Jo-Afshani⁴, S.M. Rezvani⁵, M. Khoubbane¹, M.D. Barges¹ & S. Mas-Coma¹

¹Departemanto de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avenida Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. (Patricio.Artigas@uv.es)

²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Gilan University of Medical Sciences, P.O. Box 3477, Rasht, Iran

³Department of Epidemiology and Bio Statistics, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Social Medicine, School of Medicine, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁵Gilan Province Health Center, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Fascioliasis is an important disease caused by two digenetic trematode species of the genus *Fasciola* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae): *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) and *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855. Human fascioliasis is an important health problem in the province of Gilan, at the Caspian Sea, Irán. There is the overlapping of both fasciolid species, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Recent studies on both domestic animal and lymnaeid infection furnished evidence suggesting that *Fasciola gigantica* and *Radix gedrosiana* may be the main fasciolid and lymnaeid involved in the disease in that province, controversy still being there concerning the presence and importance of *Fasciola hepatica* and other lymnaeid species. The present paper includes the results of studies on *Galba truncatula* and the first finding of natural infection by *Fasciola hepatica* in Gilan. Surveys on lymnaeids furnished the finding of a lymnaeid snail infected by trematode rediae and cercariae in a place with pastures called Taklamestan (latitude: 37,537N; longitude: 48,789E) the mountains of Talesh, in the Asalem district near the Talesh district, western Gilan. The place is located at an altitude of 1800 m, where pastures are mainly inhabited by sheep and goats, with cattle in fewer numbers. Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences proved that they were *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. The liver fluke ITS-2 sequence was identical to that of *Fasciola hepatica* from Spain and the Northern Bolivian Altiplano and that of *Galba truncatula* to the haplotype H-2 known in Portugal, Spain, France and The Netherlands. This genetic characterization suggests that both may be also involved in human fascioliasis infection in Gilan.

Work supported by funding by the School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Spanish collaboration funded by Project No. BOS2002-01978 of the DGICYT, Spanish Ministry of Science and Technology, and by the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Project No. C03/04 of the Programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa) of the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spanish Ministry of Health, Madrid.

THE MAIN VECTORS OF *Fasciola hepatica* IN SOUTH AMERICA, RIBOSOMAL AND MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS OF *Lymnaea* *neotropica* AND *Lymnaea viatrix*

ARTIGAS P.¹; R.L. MERA Y SERRA^{1,2}; S. MAS-COMA¹; M.D. BARGUES¹

¹ Departamento de Parasitología, Universidad de Valencia, Av. V.A. Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España

² Fac. Cs Médicas, U. Nacional de Cuyo Av. Libertador 80 C. Universitario, P.O. Box 33,5500 Mendoza, Argentina

INTRODUCTION

Human fascioliasis is a parasitic disease that is emerging in many areas of the world, presents varying patterns in its epidemiology. The species of lymnaeid snail that act as intermediate hosts and vectors are always crucial in the transmission of the causative parasites¹. Species in the *Galba/Fossaria* group of snail, such as *Lymnaea cubensis*, *L. neotropica*, *L. viatrix* and *Galba truncatula*, appear to be frequently involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in Central and South America^{2,3}, although specific classification within this morphologically and anatomically confusing group is often very difficult.

MATERIAL AND METHODS

To explore the potential use of molecular analysis in the identification of vector snail -regions of the ribosomal DNA, the small subunit (18S) gene and internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) and the mitochondrial DNA -the cytochrome c oxidase subunit I (COX1)- of wild-caught lymnaeid snail of *L. neotropica*, *L. viatrix* and *G. truncatula* have been sequenced. The samples of the South American species included specimens from the type localities. Total DNA was extracted, amplified and purified following standard methods. The sequence of the nuclear rDNA and mtDNA was obtained by means of an automatic sequencer using specific primers.

RESULTS

The 18S rDNA sequence of *L. viatrix* from Argentina is 1860-bp long and a GC content of 51.82%. The sequence of 18S of *L. neotropica* from the two localities in Lima, Perú, were identical, base to base, and did not differ, even by a single nucleotide, from the corresponding sequence of *L. viatrix* (GenBank Acc. No. AM412222). The ITS-2 sequences of the specimens of *L. neotropica* were identical. They differed from those of *L. viatrix* at 53 positions, giving a relatively large nucleotide divergence of 11.67%. Eleven of the 39 indels found were not related to microsatellite repeats (GenBank Acc. No. 412223). The COX1 sequences of *L. neotropica* were identical but differed from those of *L. viatrix* at 29 positions, giving a nucleotide divergence of 4.31% (GenBank Acc. No. AM494008). The genetic distances observed and the results of phylogenetic analyses demonstrate that two different species exist within *L. viatrix* s.l. *L. neotropica* (= *L. viatrix* var. B elongate⁴) from Lima, Peru, is differentiated from *L. viatrix*. (= *L. viatrix* var. A ventricosa⁴) from Frias, Rio Negro, Argentina, *L. cubensis* and *G. truncatula*.

DISCUSSION

Lymnaeids seem to have originated in the Nearctic region⁵, which currently holds the largest number of species. Although there appears to be only one member of the *Galba/Fossaria* group acting as a vector of *F. hepatica* in Europe (i.e. *G. truncatula*), in the New World studies on the transmission of *F. hepatica* are complicated by the presence of several, morphological similar members of this group, all of which can act as vectors^{6,7}. The present results show that ITS-2, ITS-1 and COX1 are good markers not only for identifying *L. neotropica*, *L. viatrix* and *G. truncatula*, in fascioliasis-endemic areas in S. America, but also for the classification of samples of these species to haplotype level.

REFERENCES

1. Mas-Coma S, In: J.A. Cotruvo, et al. Editors, WHO, *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control* 2004:305–322.
2. Mas-Coma S. *J. Helminthol* 2005; 79(3):207–216.
3. Barges MD, Artigas P, Mera y Sierra RL, Pointier JP, Mas-Coma S. *Ann Trop Med Parasit* 2007; 100(7):621–641.
4. D'Orvigny A. *Mag Zool* 1835; 5:1–44.
5. Inaba A. *Malacologia* 1969; 7(2-3):143–168.
6. Artigas P, Mera y Sierra RL, Correa AP, Morales JR, Zuriaga MA, Jiménez M, Khoubbane M, Barges MD, Mas-Coma S. *Acta Parasitol Port* 2005; 12(1-2):243–4.
7. Barges MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier- Brook C, Mas-Coma S. *Inf Gen Evol* 2001; 1(2):85–107.

Studies funded by Projects Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Proyectos Nos. C03/04, ISCIII2005-PI050574 and ISCIII-RETIC RD06/0021/0017). Proyectos No. BOS2002-01978 and No. SAF2006-09278 Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Fasciola hepatica* FROM THE WILD NATURAL HOST *Bison bonasus* OF POLAND

Artigas P.¹, M. Khoubbane¹, B. Kiziewicz², M.D. Bargues¹ and S. Mas-Coma¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. (Patricio.Artigas@uv.es)

²Department of General Biology, Medical Faculty, Medical University, Kililskiego 1, 15-089 Białystok, Poland

A genotypic analysis of the internal transcribed spacers ITS-1 and ITS-2 of the nuclear ribosomal DNA of adult liver flukes obtained by necropsy of wild bison from the Białowieża National Park (52°41'55"-52°59'15"N; 23°43'10"-23°56'30"E) in Białystok, Poland was performed. The sequences of the ITS-1 and ITS-2 was 433 bp and 365 bp, with an AT content of 47.8% and 51.2%, respectively. The ITS-1 and ITS-2 sequence analysis comparison to other sequences published for *Fasciola* spp. demonstrate complete homology with the European original genotype for *F. hepatica*, with 5 mutations (4 transitions and 1 insertion/deletion) that differentiate it from the genotype of *F. gigantica*. The embryogenic capacity of eggs was verified under experimental conditions of 20 °C and complete darkness. Fully developed miracidia were obtained at 15 days post-embryonation (dpe), with a 59,52% egg hatching rate at 19 dpe. Freshwater lymnaeid snails of the species *Galba truncatula* from Nules, Castellón, Spain were monomiracidially infected. The intramolluscan larval stage development was verified by dissection of snails and by cercarial shedding. Eggs embryogenesis and infectivity, in monomiracidial infections, may be considered as normal at 20 °C when compared to similar studies carried out with *F. hepatica* isolates and *G. truncatula* specimens from European zones. These results show the capacity of this wild host species in Fascioliasis transmission.

Funded by Projects Nos. BOS2002-01978 (Ministry of Science and Technology), PI030545 (FIS, Ministry of Health) and C03/04 and ISCIII2005-PI050574 (Red RICET, FIS, Ministry of Health), Madrid, Spain.

PRESENCE OF *Chaetogaster limnaei* (OLIGOCHAETA: NAIDIDAE) IN WILD POPULATIONS OF *Galba truncatula*, MAIN VECTOR OF FASCIOLIASIS IN EUROPE

Artigas P., M. Khoubbane, R. Flores, F. Urrea, M.D. Bagues & S. Mas-Coma

Department of Parasitology, University of Valencia, Av. V.A. Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain
(Patricio.Artigas@uv.es)

Chaetogaster limnaei is an oligochaete that is normally found in many freshwater snails, living as commensal or parasite, arranged preferably in the mantle cavity, or lung cavity housed in the mucosa of the foot. This organism feeds on particles that are removed by snails and invertebrates that swim nearby. Several studies suggest that *C. limnaei* could prevent infection by the major disease-causing parasitic flukes which may cause important health and economic problems such as schistosomiasis and fascioliasis. The study of fascioliasis requires, in many instances, to establish an experimental culture of *Galba truncatula* from wild populations. For the present study, 500 wild snails were collected, not infected by trematodes, from 3 different ecotopes of Castellón, Spain. They were morphologically identified as *G. truncatula* and confirmed by sequencing of the second internal transcribed spacer (ITS-2) of rDNA. They were kept along with a control group ($n=200$) from the same source, in a climatic chamber at 20°C temperature, 90% RH and a photophase of 12h/12h day/night. The snails were fed with lettuce *ad libitum*. A single observation under the microscope was performed every 3 days. The first day, 76% were colonized by *C. limnaei* (4-20; $10.82 \pm 4.03\sigma^2$). A greater parasitic load in the larger snails was observed. Moreover, the remaining 24% showed to be parasite-free individuals whose size was less than 2 mm. Individuals with *C. limnaei* showed a maximum of 2 weeks of survival compared with the control group (12 weeks average). Although this lower survival rate seems to not alter the ability for egg-laying, the establishment of experimental cultures with these *C. limnaei*-carrying snails appears to be more difficult and requires a longer procedure.

Studies funded by Projects Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET (Projects Nos. C03/04, ISCIII2005-PI050574 and ISCIII-RETIC RD06/0021/0017, Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa), FIS, Ministerio de Sanidad, Madrid, and Projects No. BOS2002-01978 and No. SAF2006-09278 of Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.

Póster nº 9

Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe: cinco años al servicio de la comunidad científica

Valero, M.L., Cantero, L., Dionís, E., Rejas, V., García-Murria, M.J., Sánchez del Pino, M.M.

Servicio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia.

El Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe cumple su quinto año en funcionamiento, ofreciendo soporte en el área de proteómica tanto a los laboratorios de investigación del centro, como a los de otros centros de investigación, hospitales, universidades, y empresas que lo soliciten tanto a nivel nacional como internacional. Además, desde el año 2005 la Unidad de Proteómica del CIPF está integrada en Proteored, el Instituto Nacional de Proteómica, una de las plataformas tecnológicas promovidas por la Fundación Genoma España para favorecer el desarrollo de la investigación biomédica y biotecnológica, funcionando como laboratorio coordinador del Nodo 5.

El Servicio de Proteómica del CIPF ofrece un amplio número de análisis de proteómica estandarizados con tarifas accesibles vía Internet. La naturaleza de los servicios ofertados es relativamente heterogénea y van desde la simple huella peptídica hasta servicios más sofisticados como análisis de expresión diferencial mediante tecnología DIGE o iTRAQ, la identificación de modificaciones postraduccionales o la secuenciación *de novo* para la identificación de proteínas de organismos no secuenciados. Uno de los principales objetivos tanto del laboratorio como de ProteoRed es la mejora y actualización de los protocolos y la incorporación de las metodologías emergentes en el área para satisfacer las crecientes necesidades y demandas de los usuarios. Para ello, participamos activamente y de manera continuada en pruebas de estandarización y experimentos multicentro tanto a nivel nacional (Proteored) como internacional (The Association of Biomolecular Resource Facilities, USA). Además, dentro de ProteoRed se ha implementado un sistema de evaluación continua por parte de los usuarios para garantizar la satisfacción en los servicios prestados.

El servicio de proteómica del CIPF ha sufrido desde su comienzo una adaptación en la oferta y funcionamiento motivada por una evolución en las necesidades de los usuarios y, por tanto, en la demanda del tipo de servicio solicitado. En este corto periodo de tiempo la proteómica está pasando de ser una técnica empleada de manera esporádica a una metodología que forma una parte totalmente integrada y relevante en los proyectos de investigación. Por tanto, la demanda de análisis rutinarios relativamente sencillos está dando paso a la realización de servicios personalizados para cada usuario. El servicio aporta en estos casos una importante labor de asesoramiento, participando tanto en la selección de la estrategia experimental más adecuada a cada proyecto y el diseño de los experimentos como en el análisis de los resultados.

El Servicio de Proteómica del CIPF también lleva a cabo el desarrollo de sus propios proyectos de investigación, principalmente centrados en la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico, en las interacciones proteína-proteína y en la búsqueda de biomarcadores para la detección precoz de enfermedades.

Póster nº 10

Análisis genético de *GIGYF2*, un gen candidato de la Enfermedad de Parkinson.

Vicente Andreu, José Félix Martí-Massó*, Adolfo López de Munain*, Javier Ruiz*, Jordi Pérez-Tur.

Unitat de Genètica Molecular. Institut de Biomedicina de València (C.S.I.C.) - CiberNed. Valencia.

Servicio de Neurología, Hospital Donostia - CiberNed. San Sebastián.

La proteína GIGYF2 (*Grb10-interacting GYF protein 2*) fue descrita inicialmente por su interacción con la proteína adaptadora Grb-10, que media la asociación entre la forma activa de IGF-1 y el receptor de insulina. El gen que la codifica reside en el locus PARK11 (2q37), una región ligada a las formas familiares de la Enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, existen datos contradictorios acerca de la asociación de este gen con la enfermedad. La secuenciación de la región codificante de 65 pacientes con formas esporádicas de Parkinson ha revelado mutaciones puntuales que implican cambios aminoacídicos en los exones 11, 13, 23 del gen, que no aparecen en 91 individuos control analizados. Se ha estudiado la importancia de estas mutaciones mediante un análisis de conservación de su secuencia. Por otro lado, la secuenciación del gen en enfermos de población vasca descarta la presencia de las mutaciones N56S y N457T, que han sido propuestas por otros autores como asociadas a formas familiares de la EP. Finalmente, se está analizando una región de gran inestabilidad del exón 25 del gen, con el fin de intentar determinar si existe relación entre la gran variabilidad de secuencia de esta región y las formas esporádicas de la enfermedad en población vasca.

High throughput sequencing of the small RNAs derived from citrus tristeza virus reveals an asymmetric distribution along the RNA genome

Susana Ruiz¹, Beatriz Navarro², Andreas Gisel³, Leandro Peña⁴, Luis Navarro⁴, Pedro Moreno⁴ Francesco Di Serio² and Ricardo Flores¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), 46022 Valencia, Spain, ²Istituto di Virologia Vegetale del CNR, 70126 Bari, Italy, ³Istituto di Tecnologie Biomediche del CNR, 70126 Bari, Italy, and ⁴Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Valencia, Spain

Plants, and other higher eukaryotes, have developed an RNA-based antiviral silencing response triggered by double-stranded (or highly-structured single-stranded) RNA that elicits its degradation by RNase III-like enzymes (DICER-like, DCL) and lead to virus derived small RNAs (vsRNAs) of 21-24 nt, which then guide an RNase H-like enzyme against the viral single-stranded RNAs. Viruses have reacted to this defense mechanism by encoding suppressors of RNA silencing in their genomes. Because RNA silencing also regulates plant development through endogenous small RNAs, with both pathways overlapping to some extent, developmental defects incited by viruses have been regarded as a side effect of their suppressors converging in both pathways, although other data indicate that this may not necessarily occur in all cases. Citrus tristeza virus (CTV) has the largest plant virus genome, composed by a single-stranded (+) RNA of about 19.3 kb organized in 12 open reading frames (ORFs) potentially encoding at least 17 protein products flanked by 5' and 3' untranslated regions. The two 5' proximal ORFs, which are directly translated from the genomic RNA, encode components of the replicase complex while the 3' proximal ORFs encoding ten proteins, three of which are silencing suppressors, are expressed via 3' co-terminal subgenomic RNAs. CTV infection occurs with the accumulation of vsRNAs, but there is no detailed information about their physical properties and distribution along the viral genome. To fill this gap we have analyzed by deep sequencing (Solexa-Illumina platform) and computational approaches the vsRNAs from stem bark of Mexican lime and sour orange infected by a severe CTV isolate. Our data show that the CTV-sRNAs: i) represent more than 50% of the total small RNAs in Mexican lime (where CTV reaches relatively high titers) but only 3.5% in sour orange (where CTV titers are significantly lower), ii) are predominantly of 21-22 nt and, iii) adopt an asymmetric distribution along the genomic RNA with a major hotspot covering approximately the 3'-terminal 2000 nt. Assuming that citrus DCLs have the same properties as their Arabidopsis homologues these results suggest that DCL4 and DCL2, which operate hierarchically in antiviral defense, most likely mediate the genesis of the 21- and 22-nt CTV-sRNAs acting upon the genomic and 3' co-terminal subgenomic RNAs.

Funding: Prometeo/2008/121 (Generalitat Valenciana)

***In silico* structural analysis of LRRK2 and effects of Parkinson-related mutations**

Marta Tormos, Jordi Pérez-Tur and Fernando Cardona

Unitat de Genètica Molecular. Institut de Biomedicina de València (C.S.I.C.). Valencia - CiberNED. Spain

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder for which there is not known cure, and for which have been proposed as causes genetic and environmental factors. The *LRRK2* gene (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*, PARK8) is mutated in a significant number of cases of autosomal dominant PD and in some sporadic cases of the late-onset type of the disease, so that knowledge of function of the protein provides an opportunity for deciphering molecular pathways important in neurodegeneration, particularly in which causes PD. LRRK2 is a large and complex multidomain protein that comprises several interaction domains: armadillo-type repeats, ankyrin-type repeats, leucine-rich repeats (LRR) and a C-terminal WD40 domain, two catalytic domains: ROC-GTPase and a kinase of the threonine/serine kinases subfamily, and a domain of unknown function: COR (C-terminal of ROC). Pathogenic mutations are scattered over all the functional domains of LRRK2, despite the high prevalence of mutations in some domains such as p.R1441C/G in the ROC-GTPase, p.Y1699C in the COR domain, and G2019S in the kinase. In this work we analyze *in silico* the structure of each domain of LRRK2 with different bioinformatic tools to predict, by sequence homology and threading, and explore the effects of described mutations in the structure. The results allow us to postulate the possible effects of pathogenic mutations in the function of the protein, and hypothesize the importance of some polymorphisms that have not been linked directly to the EP but could be related as risk factor, such as the p.N363S in the armadillo domain, p.R793M in the ankyrin domain and p.R1067Q in the LRR domain, among others.

THE ENTEROCYTE PROTEOME OF GILTHEAD SEA BREAM (*SPARUS AURATA*) ACCLIMATED TO TWO SALINITY CONDITIONS

Varó^{1,2}, I; Rodríguez³, C., Viciano², E, Navarro², JC; Torreblanca¹, A.

¹ Departamento de Biología Funcional Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia. Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot (Valencia, Spain).

² Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, (Spain).

³ Laboratorio de Fisiología, Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna, 38206 La Laguna, (Tenerife, islas Canarias, Spain).

Abstract

The Mediterranean Sea and the coastal aquatic systems are, as a result of the climate change, experiencing a warming of the surface and deep waters. An increase in the average temperature and in the number of “heat waves” is predicted, in which the temperature of the surface waters may reach considerable levels, and not ruling out changes in the levels of salinity in some areas. In fish, the acclimatization to changes in salinity and temperature is associated with changes in the composition of lipids and proteins. These changes can be detected at a molecular level and may constitute a useful tool for the tracking of the effects of the global changes on aquacultured fish species of interest. The gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is a valuable euryhaline species in the Mediterranean aquaculture, adapted to survive in a wide range of salinity. The intestinal epithelium is involved in osmoregulation in fish. In the present work we investigated the proteome of enterocytes, in order to search for new proteins that could be useful as biomarkers to evaluate the response of euryhaline cultured fish to salinity changes. Gilthead sea bream of 350 g were acclimated to high (37 ‰) and low salinity (18-20 ‰) for 5 months. 2D difference gel electrophoresis (DIGE) was performed to identify protein profiles related to osmoregulation. Analyses of the gels image scanning were carried out with the DeCyderTM (V. 6.5) software, and the statistical module EDA (V.1.0) was used for multivariate statistical analysis of data. A total number of 34 proteins were differentially expressed as consequence of salinity acclimation ($p \leq 0.02$). Among these proteins, 16 increased in the group acclimated to high salinity, whereas 18 decreased. Mass spectrometry and database research is being performed to identify these differentially expressed proteins involved, presumably, into the acclimatory processes of the gilthead sea bream to salinity changes.

Keywords: Proteomics, DIGE, salinity, Enterocytes, Biomarkers, gilthead sea bream

Acknowledgements:

This work was funded by project CTM 2006-14279-CO2-01/MAR and CTM 2006-14279-CO2-02/MAR MEC-FEDER. I. Varó was a recipient of a Ramón y Cajal contract MEC (Spain). DIGE analysis was performed in the proteomics service of University of Valencia (SCSIE), Valencia (SPAIN). We thank to Oreto Antúnez for their technical support.

THE HEPATIC PROTEOME OF GILTHEAD SEA BREAM (*SPARUS AURATA*) ACCLIMATED TO TWO SALINITY CONDITIONS

Varó^{1,2}, I; Navarro², J; Del Ramo¹, J.;Torreblanca¹, A.

¹ Departamento de Biología Funcional Biology, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia. Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot (Valencia, Spain).

² Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, (Spain).

Abstract

The gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is valuable euryhaline specie in the Mediterranean aquaculture, adapted to survive in a wide range of salinity. The aim of this study was to identify, by a proteomic approach, changes in the liver as response to acclimation to salinity that may be indicative of metabolic adjustments to the physical and chemical environmental conditions.

Gilthead sea bream of 350 g were acclimated to high (37 ‰) and low salinity (18-20 ‰) for 5 months. Difference Gel Electrophoresis Technology (2D-DIGE) was used to study the effect salinity in liver protein profile. Resulting gels images were analyzed by DeCyder™ (V. 6.5) software and the statistical module EDA (V.1.0) was used for multivariate statistical analysed of data. The results showed significant changes in the expression of 24 proteins between high and low salinity group ($p \leq 0.02$). Among these proteins, a total of 11 increased in abundance and 13 decreased in the group acclimated at high salinity. Mass spectrometry and database research is being performed to identify these differentially expressed proteins involved, presumably, into some homeostatic processes that would explain the gilthead sea bream tolerance to a broad salinity range.

Keywords: Proteomics, DIGE, Salinity, Biomarkers, Liver gilthead sea bream

Acknowledgements:

This work was funded by project CTM 2006-14279-CO2-01/MAR and CTM 2006-14279-CO2-02/MAR MEC-FEDER. I. Varó was a recipient of a Ramón y Cajal contract MEC (Spain). DIGE analysis was performed in the proteomics service of University of Valencia (SCSIE), Valencia (SPAIN). We thank to Oreto Antúnez for their technical support.

CLONING AND IDENTIFICATION OF A COMPLETE CDNA SEQUENCE OF BP-LAAO: AN L-AMINO ACID OXIDASE ISOLATED FROM *BOTHROPS PAULOENSIS* SNAKE VENOM

Renata S. Rodrigues¹, Johara Boldrini-França², Fernando P. P. Fonseca³, Francis Barbosa Ferreira¹, Antônio R. Otaviano¹, Flávio Henrique-Silva³, Angelo J. Magro⁴, Antônio Sérgio K. Braz⁵, Juliana I. dos Santos⁴, Marcos R. M. Fontes⁴, Andreimar M. Soares², Veridiana M. Rodrigues¹

¹Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais, Uberlândia, MG, Brazil; ²Laboratório de Toxicologia de Venenos Naturais e Inibidores, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Laboratório de Biologia Molecular, São Carlos, SP, Brazil; ⁴Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, Botucatu, SP, Brazil ⁵Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, Botucatu, SP, Brazil.

Email: rsantos.rodrigues@gmail.com

Snake venom LAAOs have become an interesting object for structural and molecular biology studies. Although little is known about their primary and tertiary structures, through the analysis of their putative amino acid sequences the possible FAD-binding and N-glycosylation sites were established and phylogenetically compared. Venom gland from *B. pauloensis* adult snake was dissected and total RNA was extracted by the Trizol method. The mRNA was purified and 3µg of mRNA were used in CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen). The primers used were designed according to the N-terminal sequence of toxin and also through multiple alignments with other similar toxins. The alignment of the selected sequences was performed by program AMAP v.2.0. Phylogenetic analysis was executed using the programs TREE-PUZZLE v.5.2 The crystallographic model of Bp-LAAO was obtained from the based-threading method program HHpred. Bp-LAAO-cDNA showed 1,548 bp encoded an open reading frame of 516 amino acid residues with a theoretical isoelectric point and molecular weight of 6.3 and 58 kDa, respectively. The svLAAOs from viperids and elapids were clearly divided in two monophyletic groups in phylogenetic analysis. Additionally, structural studies identified residues under positive selection and their probable location in Bp-LAAO and other snake venom LAAOs (svLAAOs). Some functional and structural studies with svLAAOs have demonstrated their high biotechnological potential for design of novel therapeutic agents.

Financial Support: FAPEMIG, FAPESP and UFU.

Keywords: *Bothrops (neuwiedii) pauloensis*, L-amino acid oxidase, cDNA library; phylogenetic analysis.

DINÁMICA DE LAS MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS DURANTE LA ACTIVACIÓN Y REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL PRODUCIDA POR ESTRÉS SALINO EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L. Magraner, V. Pelechano, V. Tordera

Laboratori de modificacions d'histones, Departament de bioquímica i biologia molecular, Universitat de València.

Es conocido que el nivel de acetilación promedio de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (H3K9ac y H3K14ac) es máximo en la región de inicio de las ORFs decayendo suavemente tanto a lo largo de éstas como hacia el promotor y que además existe una correlación positiva entre el nivel de acetilación de ambas lisinas y la tasa de transcripción. De los más de 6000 genes presentes en el genoma de *S. cerevisiae*, el estrés salino tiene como consecuencia la activación de 289 genes y la represión de otros 443. Aplicando la técnica de ChIP-Chip hemos determinado los niveles de H3K9ac y H3K14ac antes y después de un estrés salino. Los genes inducidos por sal presentan, previamente al estrés, un nivel promedio de H3K9ac inferior al del conjunto de genes de la levadura, especialmente en la región más cercana al inicio de la transcripción. Tras el estrés, H3K9ac de estos genes se incrementa muy por encima del conjunto de genes y aunque este incremento se produce a lo largo de todo el gen, es especialmente relevante en el promotor y región de inicio de la ORF. Por el contrario, los genes reprimidos por estrés, que presentan niveles de H3K9ac muy semejantes al resto de genes en el inicio de la ORF antes del estrés, sufren una severa desacetilación de esta lisina, en ese mismo lugar, tras el estrés. En cuanto a H3K14ac, ésta no sufre apenas variaciones en los genes inducidos por estrés con respecto al conjunto de genes. Sin embargo, la H3K14ac de los genes reprimidos por estrés, que tienen un perfil de acetilación semejante al del conjunto del genoma antes de la adición de sal, tras la adición de ésta sufren, al igual que H3K9ac, una fuerte desacetilación en el promotor y zona de inicio de la ORF, igualándose a la del promedio en la zona media de la ORF.

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN DE DNA, GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES.

Amparo Martínez

SCSIE-UNIVERSITAT DE VALENCIA. Edificio de Investigación Jeroni Muñoz. Lab. 0-49. C/ Dr. Moliner 50. Burjassot -4610, Valencia. (secuenciacion@uv.es)

En la actualidad numerosos grupos de investigación están involucrados en proyectos que incorporan estudios genéticos. Sin embargo, el elevado coste y la naturaleza especializada de algunas técnicas dificulta el que cada grupo de investigación pueda disponer del equipamiento necesario para los estudios de secuenciación o genotipado a gran escala. Por este motivo y con el propósito de proporcionar tanto soporte técnico como equipamiento, se creó el Laboratorio de Secuenciación de DNA, Genotipado y Análisis de Marcadores Moleculares que forma parte de la Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universitat de València. El aumento progresivo del equipamiento científico adquirido así como la incorporación de nuevo personal especializado ha hecho posible que el laboratorio preste su apoyo a un elevado número de investigadores de instituciones públicas y privadas de la Comunidad Valenciana y también del ámbito estatal e internacional.

En nuestro laboratorio se desarrollan protocolos y proyectos basados en diferentes técnicas de Genética y Biología Molecular que se pueden agrupar en las siguientes áreas:

- Secuenciación automática de DNA mediante electroforesis capilar
- Genotipado de diversos marcadores de DNA:
 - o análisis cualitativos de RFLPs, STRs o microsatélites, SNPs
 - o análisis semicuantitativos como estudios de MLPA y CNVs
- Determinación y análisis de la variación genética de marcadores moleculares aplicados al estudio de especies determinadas.
- Estudios de expresión génica mediante PCR en tiempo real

Además, en el SCSIE se pretende proporcionar acceso a las tecnologías más innovadoras, con lo que se va a poner a disposición de los todos los grupos de investigación de la Universitat de València u otros centros públicos o privados, una plataforma de secuenciación masiva y el personal técnico necesario para el desarrollo de proyectos de campos tan diversos como secuenciación genómica, transcriptómica, mecanismos epigenéticos, genética clínica, epidemiología, metagenómica, etc.

**NUEVAS ESTRATEGIAS GENÓMICAS PARA EL MAPEO PRECISO DE
POLIMERASAS EN TRANSCRIPCIÓN ACTIVA EN *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*.**

Antonio Jordán-Pla, Vicent Pelechano, José E. Pérez-Ortín.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de València

De especial interés en el ámbito de la genómica funcional en eucariotas es el estudio del comportamiento preciso de la maquinaria enzimática responsable de la transcripción, en particular del de sus componentes principales, las RNA Polimerasas. Tomando como punto de partida tecnologías de alto rendimiento actualmente disponibles como los microarrays de embaldosado (*tiling*) y las nuevas plataformas de secuenciación masiva paralela, hemos logrado desarrollar en nuestro laboratorio diversas estrategias capaces de cartografiar de manera muy precisa la densidad y localización de aquellas RNA Polimerasas involucradas en eventos de transcripción activa a lo largo de todo el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante el marcaje *in vivo* de los RNAs nacientes con diversos análogos nucleotídicos, y la posterior purificación selectiva de los mismos. Con ello seremos capaces de obtener nueva y valiosa información acerca de la organización de la transcripción en esta levadura.

Studying the functions of yeast Sac3p using functional genomics.

Priyanka Palit¹, Alwin Koehler² Oretó Antúñez¹, Vicent Pelechano^{1,3}, Ana Miguel¹, Fany Carrasco¹ José García-Martínez¹, Ed Hurt² and José E. Pérez Ortín¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de Valencia. Burjassot. España

²Biochemie-Zentrum Universität Heidelberg. Alemania

³EMBL. Heidelberg. Alemania

priyanka.palit@uv.es

The Sac3 protein binds to the nuclear pore complex cytoplasmic fibrils in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It facilitates the transfer of mRNA across the nucleus and is responsible for transcription elongation as well. The protein forms a part of the TREX-2 (Transcription and Export) complex. In our study we have divided the protein into two main regions. The N domains, which are responsible for transcription elongation and the central region (Sac3^{CID}) that binds to Sus1p and Cdc31p and is involved in the mRNA export. Here we are testing the effects of two mutants of this protein on the in gene expression in yeast. *Sac3N+M-myc* lacks the C-terminal domain which is responsible for correct targeting of Sac3 to the nuclear pore and is deficient in export. The *sac3Δ* mutant is a complete deletion of the gene.

We performed a GRO (Genomic Run On) (1) experiment on the two *sac3* mutants with the wild type strain *BY4741* strain as the control. In this way we can estimate the transcription rates and mRNA amounts for each gene compared with the wild type.

Although, in general, the mutants behaved similarly to the wild type in transcription rates, there are however, some genes significantly up regulated in the mutants belonging to groups with unknown functions. The significantly downregulated genes belonged to ribosome biogenesis, ribosome protein genes and amino acid synthesis. We also noticed that in the *sac3Δ* mutant that there was an up regulation in the subtelomeric regions.

References:

- 1) García-Martínez, J., Aranda, A. and Pérez-Ortín, J.E. (2004). Mol. Cell 15, 303-313.

Cooperativity of Protein Binding to Vesicles

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

Electrostatics role is studied in cationic protein adsorption to zwitterionic phosphatidylcholine (PC) and anionic mixed PC/phosphatidylglycerol (PG) small unilamellar vesicles (SUVs). Protein interaction is monitored vs. PG content at low ionic strength. The adsorption of lysozyme–myoglobin–bovine serum albumin (BSA) isoelectric point (pI 5–11) is investigated in SUVs, along with the changes of the fluorescence emission spectra of the proteins, via their adsorption on SUVs. The partition coefficients and cooperativity parameters are calculated. At pI the amount of binding obtains the maximum, while at lower and higher pHs the binding is significantly decreased. In Gouy–Chapman formalism activity coefficient goes with square charge number, which deviations indicate the asymmetric location of the anionic phospholipid in the bilayer inner leaflet, in mixed zwitterionic/anionic SUVs for both lysozyme– and myoglobin–PC/PG systems, in agreement with experiments–molecular dynamics simulations. Vesicles bind myoglobin anti-cooperatively while lysozyme–BSA cooperatively, which is explained by a new model. Apparently, the structures of the attached lysozyme–BSA layer on the protein–SUVs play a significant role. A model for both proteins, which composes two protein sub-layers with different structures–properties, is proposed. The Hill coefficient reflects the subunit cooperativity of the bi/tridomain proteins. Provisional conclusions follow. (1) The maximum binding occurred at the isoelectric point of lysozyme–BSA, suggesting complementary electrostatic-driven adsorption. The binding has moderate cooperativity because of the protein–protein interaction. (2) For monovalent ions the Gouy–Chapman model is correct; however for multivalent ions it is semi-quantitative. The γ is obtained as $\ln \gamma \propto \nu \sinh^{-1}(\nu)$. As $\Gamma \propto \gamma$ at constant ν it is expected $\ln \Gamma \propto \ln \gamma \propto z_L \sinh^{-1}(z_L) \approx z_L^2$. For lysozyme– myoglobin adsorptions on mixed zwitterionic/anionic PC/PG vesicles, deviations from the ideal model indicate the asymmetric location of anionic phospholipid, in the inner leaflet of bilayer, in agreement with experiments–molecular dynamics simulations. Effective interfacial charge stays constant for PC/PG. (3) Partial correlation diagram–dendrogram–radial tree–splits graph–principal component analysis classify in three classes both bindings: {lysozyme/PC, myoglobin/PC, myoglobin/PC/PG 95/5, 90/10, 80/20}, {lysozyme/PC/PG 95/5, 90/10, myoglobin/PC/PG 60/40} and {lysozyme/PC/PG 80/20, 60/40}, and properties: $\{z_p^+, \Delta \bar{G}_p^{o,A}, \Delta \bar{G}_p^{o,L}\}$, $\{I\}$ and $\{\nu\}$. (4) On the protein–vesicle binding model both protein and vesicle effects were analyzed. Some qualitative and quantitative differences for proteins adsorbed on vesicles were observed. Myoglobin, DNC-melittin and melittin association to zwitterionic vesicles can be described by a simple model, incorporating a water–membrane partition equilibrium, modulated by the electrostatic charging of the membrane as the protein accumulates at the interface. The induced surface potential counteracts further protein association, which can be treated by using a Gouy–Chapman approach. Further protein binding is difficult because the repulsion of like charges becomes dominant. In terms of conventional binding mechanisms, which do not take into account electrostatic effects, this would correspond to a negative cooperativity. On the other hand, lysozyme and albumin binding to zwitterionic and anionic vesicles follow a schematic simplified model of positive cooperativity, which represents the interaction between the protein considered as a dipole moment and the anionic phospholipid headgroups taken as an isolated anion. The Hill coefficient reflects subunit cooperativity of the bi/tridomain proteins. (5) In mixed zwitterionic/anionic vesicles the charge effect on the protein binding model was analyzed. For lysozyme–anionic enough vesicles and myoglobin, the electrostatic repulsion between cationic ad-proteins dominates over the electrostatic attraction between ad-protein dipoles. (6) The salt effect on the protein binding model of mixed zwitterionic/anionic vesicles was analyzed. The cooperativity increases with ionic strength, meaning that the electrostatic repulsion between cationic ad-proteins decays with increasing salt effect, and the electrostatic attraction between ad-protein dipoles becomes dominant over the electrostatic repulsion between ad-protein charges. (7) In anionic vesicles, the effect of vesicle charge on protein binding shows that with increasing anionic character of the vesicles, the protein–protein electrostatic repulsion is decreasingly important vs. the protein–vesicle attraction, and the electrostatic attraction between ad-protein dipoles becomes dominant over the electrostatic repulsion between ad-protein charges. (8) For lysozyme–mixed zwitterionic/anionic vesicles and myoglobin cooperativity increases with pH. With increasing pH and decaying cationic character of the protein, the protein–protein electrostatic repulsion is decreasingly important against the protein–vesicle attraction, and the electrostatic attraction between ad-protein dipoles becomes dominant over the electrostatic repulsion between ad-protein charges. Furthermore the opposed effect is observed for lysozyme–zwitterionic vesicles. (9) For protein–mixed zwitterionic/anionic vesicle binding the results showed the greatest dispersion, which could indicate the asymmetric location of anionic phospholipid in the inner leaflet of bilayer in agreement with experiments and molecular dynamics simulations.

Identification of new protein associations involving the chromatin regulator Gcn5

Sara Vicente¹, Luz Valero², Gwendoline Watteau¹, Ernest Machí¹ and Mercè Pamblanco¹

¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València

² Servicio de Proteómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe

The regulation of chromatin structure is essential to the maintenance, expression and transmission of eukaryotic genomes. Remodelers, histone chaperones and histone-modifying enzymes, contribute to chromatin dynamics. The posttranslational modification of histones by reversible acetylation is one of the best characterized processes in regulating chromatin structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Gcn5 is a histone acetyltransferase (HAT) that takes part of at least four functionally different complexes and regulates the transcription of up to 10% of yeast genes. Previously, we have shown that Gcn5 and another HAT, Sas3, are recruited to similar genes. Intriguingly, a recent work proposed a role for Gcn5 in chromatin assembly together with Asf1, a histone chaperone. Currently, we use the TAP (Tandem Affinity Purification) strategy to purify native protein complexes in order to study both, the HAT activity and the components by mass spectrometry. Here we have purified complexes associated to Gcn5 from TAP strains deleted or not in *SAS3* gene and both purifications present HAT activity over histones H3 and H4. Gcn5 copurifies with components of ADA and SAGA complexes (except Chd1, Sgf11 and Sus1), although in the *sas3* mutant, Spt3 and Ubp8 are also absent. Interestingly, many components of SAGA and TREX2 complexes copurify together with Asf1 suggesting new functions for this histone chaperone mediated by Sus1, a protein shared by these two complexes. Using a different extraction buffer, the copurified proteins are basically Rad53 and histones; this suggests the participation of Asf1 in another new complex. Spectrometric analyses also allowed us to identify a diversity of posttranslational modifications present on some of the copurified proteins, specially in Asf1 and histones H3 and H4.

LA SECCIÓN DE CHIPS DE DNA del SERVEI CENTRAL DE SUPOR A LA INVESTIGACIÓ EXPERIMENTAL (SCSIE) de la UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

José García-Martínez.

Secció de Xips de DNA. S.C.S.I.E. Universitat de València

En esta Sección, integrada en el Servei Central de Suport a la Investigació de la Universitat de València, se desarrolla la tecnología de arrays de DNA tanto en su versión de macro- (sobre nylon) como de microchips (sobre vidrio).

Para ello se dispone de la tecnología para la fabricación de Macrochips (filtros) de DNA, basada en la utilización de productos de PCR específicos de cada gen que se fijan sobre filtros de Nylon mediante un sistema robotizado a una densidad de 75 muestras/cm² y permitiendo analizar el genoma completo de un organismo o un número muy elevado de sus genes en un solo experimento. Debido a que la detección de las señales en los filtros de nylon se debe hacer mediante marcaje radioactivo, también se dispone del correspondiente phosphorimager para captar dichas señales i generar imágenes de las hibridaciones.

Análogamente se dispone también de un robot para la fabricación de "Microseries" (microchips) en soporte de vidrio, con la consiguiente mayor densidad de impresión y mayor numero de genes analizados simultáneamente. En este caso debido a que el marcaje es fluorescente, se dispone de un scanner con 2 láseres que permite el analisis de 2 muestras simultáneas hibridadas sobre el mismo array.

En ambos casos se dispone del software correspondiente para analizar las imágenes de hibridacion generadas y poder cuantificar las intensidades de cada uno de los spots tras la hibridación.

En breve se va a disponer de un nuevo equipamiento de secuenciación masiva que permitirá igualmente realizar estudios de expresión a nivel genómico.

En cuanto a los servicios que se ofertan serían los siguientes:

- Comercialización del macrochip de genoma completo de levadura.
- Impresión de chips "a la carta", tanto en la versión macro como micro, a partir de las sondas de usuario, o mediante la obtención de dichas sondas por el precio servicio.
- Procesado experimental de los chips, tanto marcaje radioactivo para macroarrays como fluorescente para microarrays. Estos últimos, también los microarrays comerciales para cualquier organismo.
- Análisis estadísticos de los resultados, y entrega de resultados finales de la comparación entre condiciones.
- Análisis de condiciones múltiples, y agrupamientos de perfiles (clustering).

UNITAT DE PROTEÒMICA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Oreto Antúnez y Armand Congost

Servei Central de Suport a la Investigació Experimental

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 de proteïnes per cromatografia bidimensional o 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.

REGULATION DURING TRANSCRIPTION ELONGATION IN YEAST GENES

Vicent Pelechano¹, Silvia Jimeno-Gonzalez², José García-Martínez³, Alfonso Rodríguez-Gil², Sebastián Chávez² and José E. Pérez-Ortín¹

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

We have developed a method to map the genomic location of RNA polymerase II (RNA pol ChrlP-chip, RPCC) on yeast genes. Using it we have measured the density of the different forms of RNA polymerases on each gene and, subsequently, we have compared the results for all genes obtained for cells growing exponentially, with those obtained by a different method (GRO) for RNA polymerase density estimation based on transcriptional run-on (1). Both kinds of results correlate quite well (2). However, there are some interesting gene-specific discrepancies that can cast light on the mechanisms of yeast transcription. Our main conclusion is that some gene classes, especially the group of genes encoding ribosomal proteins, show a high proportion of non-elongating RNA polymerases. This result is dependent on the silencing domain of Rap1 protein. The genomic distribution of Spt16p (FACT), together with the effect of Spt16p depletion on TR, also suggest that ribosomal protein genes are differently transcribed, since they show a higher presence and a lower dependence of Spt16 than the rest of the genome.

We also have studied the differences between GRO and RPCC in different physiological conditions and mutants. We conclude that there is a regulation of the ratio of inactive RNA polymerases along the transcribed region according to the physiological conditions. This implies a regulation at the level of transcription elongation acting, at least, in some gene groups.

We propose that RNA polymerase II-dependent machinery has more than one way of transcribing a yeast gene, and that these differences are related to the function and regulation strategy of each group of genes (3).

1.- García-Martínez, J., Aranda, A. and Pérez-Ortín, J. E. (2004). Mol. Cell 15, 303-313.

2.- Pérez-Ortín JE (2008). Brief. Funct. Genom. Proteom., 6:282-91.

3.- Pelechano et al (2009). Aug;5(8):e1000614