

***Conferencias Plenarias:***

*Iniciativas actuales en Genómica y  
Proteómica*

# IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PROGRESIÓN DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS MEDIANTE PROTEÓMICA DIFERENCIAL

Fernando J. Corrales.

Laboratorio de Proteómica. Fundación para la Investigación Médica Aplicada y Universidad de Navarra. Pío XII, 55. 31008 Pamplona

A pesar de que muchos de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades hepáticas son conocidos, los mecanismos moleculares asociados su progresión sólo se han descrito parcialmente. Una de las alteraciones comunes a la mayoría de las lesiones de hígado es la deficiencia en la síntesis hepática de S-adenosilmetionina (AdoMet), mediada bien por la inactivación de la enzima responsable de su síntesis, la metionina adenosiltransferasa (MAT), o por el silenciamiento del gen que la codifica (*MAT1A*). En nuestro laboratorio hemos utilizado un modelo de ratón knockout para el gen *MAT1A* (*MAT1A* -/-), que desarrolla espontáneamente esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y hepatocarcinoma (HCC), para estudiar los cambios del proteoma hepático asociados a la progresión de estas enfermedades e identificar potenciales marcadores que planteen nuevas expectativas a la investigación clínica. Hemos identificado proteínas que indican una disfunción mitocondrial temprana en el hígado del ratón KO. Entre ellas cabe destacar la prohibitina, cuyos niveles están regulados de forma directa por AdoMet. El análisis de nódulos tumorales de diferentes ratones presentó una variabilidad en los perfiles proteómicos 10 veces superior a la observada en cualquier otro grupo experimental incluidos los estudios comparativos de nódulos procedentes de un mismo ratón. Esta observación sugiere que la heterogeneidad inter-individual es, probablemente, consecuencia, tanto de un proceso estocástico asociado al crecimiento tumoral, como de factores específicos de cada individuo que podrían imponer una presión selectiva sobre los focos preneoplásicos. Hemos identificado cambios en los niveles de más de 150 proteínas, 25 de las cuales son comunes a más del 50% de los tumores analizados. Mediante estudios de PCR cuantitativa confirmamos cambios en los niveles de expresión génica de 13 de estas proteínas en tumores humanos.

# EQUALIZER BEADS: THE QUEST FOR A "DEMOCRATIC PROTEOME"

P.G. Righetti (1), A. Castagna (1), E. Boschetti (2), L. Lomas (2)

(1) *University of Verona, Department of Industrial Agricultural Biotechnologies, Strada Le Grazie 15, Verona 37134, Italy*

(2) *Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, USA*

No proteome can be considered "democratic", but rather "oligarchic", since a few proteins dominate the landscape and often obliterate the signal of the rare ones. That is the reason why most scientist lament that, in proteome analysis, we keep seeing again and again the same set of proteins. A host of pre-fractionation techniques have been described (as reviewed in 1), but all of them, one way or another, are besieged by problems, in that they are based on a "depletion principle", *i.e.* getting rid of the unwanted species. Yet "democracy" calls not for killing the enemy, but for giving "equal rights" to all people. One way to achieve that would be to use "Protein Equalizer Beads". They consists in a library of combinatorial ligands coupled to 65  $\mu\text{m}$  beads. Such a library comprises hexameric ligands composed of 20 natural amino acids, resulting in up to 64 million different structures. When these beads are impregnated with complex proteomes (e.g., human sera, egg white, any cell lysate, for that matter) of widely differing protein composition, they are able to "equalize" the protein population, by sharply cutting the peaks of the most abundant ones while simultaneously enhancing the concentration of the most dilute components. It is felt that this novel method could offer a strong step forward in "mining below the tip of the iceberg" for detecting the "unseen proteome" and, in the long run, might represent a big revolution in proteome analysis. Examples will be given of equalization of human urine and sera samples, resulting in the discovery of a host of proteins never reported before [2]. Additionally, these beads can be used for purifying to homogeneity r-DNA proteins meant for human consumption. These proteins typically reach a purity of the order of 98%: higher purities would be prohibitively expensive. Yet, if incubated with "equalizer beads", these last impurities will be fully removed at a small cost and minute losses of main, valuable product.

(1) Righetti, P.G. et al., *Electrophoresis* 26 (2005) 297-319.

(2) Righetti et al., *Clin. Chim. Acta* 357 (2005) 123-139.

# GENÓMICA FUNCIONAL DE LA RESISTENCIA LOCAL Y SISTÉMICA ADQUIRIDAS EN EL SISTEMA *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae*

José León

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV)*  
*Avda de los Naranjos s/n 46022 Valencia. [jleon@iobmcp.upv.es](mailto:jleon@iobmcp.upv.es)*

En las plantas, a diferencia de lo que ocurre en animales, la activación de mecanismos de defensa frente a patógenos no depende de la función de células especializadas ni de la participación de un sistema inmunitario altamente especializado y eficiente. En plantas infectadas por un patógeno cada célula es potencialmente capaz de activar mecanismos de resistencia. Uno de estos mecanismos, el denominado resistencia sistémica adquirida (SAR), confiere a una planta inicialmente infectada por un patógeno, la capacidad de activar resistencia frente a siguientes ataques por patógenos. Esta resistencia es de naturaleza sistémica, lo que implica la intervención de señales móviles que han de ser sintetizadas en las proximidades del sitio de inoculación, movilizadas, y su información transmitida a través de vías de señalización que conducen a fenómenos de activación génica relacionados con defensa. La resistencia adquirida resultante es duradera pero no permanente y protege no sólo frente al patógeno que la activó sino frente a un amplia gama de patógenos no relacionados. El proyecto SARA (Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis), desarrollado por seis laboratorios de Alemania, España y Francia, está centrado en el análisis de la activación y mantenimiento de SAR en el patosistema *Arabidopsis*- *P.syringae*, desde un perspectiva genómico funcional. Para ello, estamos desarrollando estrategias típicas de la transcriptómica, proteómica y metabolómica combinadas para analizar los procesos y componentes involucrados en la activación y regulación de SAR. En concreto los dos laboratorios nacionales que participamos en el proyecto SARA desarrollamos dos subproyectos, el primero relacionado con el análisis transcriptómico y de la variabilidad natural en SAR, dirigido por el Dr. Pablo Tornero (IBMCP-UPV); y el segundo, centrado en el análisis del nitroproteoma y del proteoma poliubiquitinado y su función reguladora en SAR, dirigido por el Dr. José León (IBMCP-CSIC). Nuestra aproximación genómica está basada en análisis comparados de plantas silvestres y un grupo de mutantes afectados en distintos niveles de la activación de SAR, siguiendo un esquema espacio-temporal previamente definido. Nuestra intención es la de generar datos cualitativos y cuantitativos que nos permitan analizar el fenómeno de SAR desde una perspectiva espacio-temporal así como integrar dicha información en un modelo que nos permita hacer predicciones.

# **PROGRAMA MARCO DE I+D DE LA UNION EUROPEA**

## **“Ciencias de la Vida, Genómica y Biotecnología aplicadas a la Salud”**

Eduardo Castañeda.

**Delegado Español de “Ciencias de la Vida, Genómica y Biotecnología aplicadas a la Salud” en la Unión Europea. CDTI.**

1. 4ª última convocatoria del VI Programa Marco (2002 – 2006)
  - Programa de Trabajo
  - Presupuesto por áreas
  - Fechas de apertura y cierre
  - Instrumentos para participar
  - Especial Pymes
  - Evaluación de Proyectos
  - Proceso de participación
  
2. Hacia el VI Programa Marco (2007 – 20013)
  - Novedades
  - Presupuesto
  - Areas
  - Objetivos
  - Instrumentos para participar
  - Plataforma Tecnológica “ Medicinas Innovadoras”
  - Plataforma “espejo” española. Grupos de Trabajo

## **Sesión I:**

*“Redes y sociedades en Genómica y Proteómica”*

# **EL INSTITUTO NACIONAL DE BIOINFORMÁTICA: UNA PLATAFORMA TECNOLÓGICA AL SERVICIO DE LA COMUNIDAD CIENTÍFICA**

Joaquín Dopazo.

*Centro Príncipe Felipe de Investigación.*

Uno de las plataformas recientemente lanzadas por Genoma España es el Instituto Nacional de Bioinformática (INB). Se trata de un Instituto virtual, formado por cinco nodos de Bioinformática con distintas orientaciones (Proteómica, Genómica, Transcriptómica, Estructura y modelación, e Integración), otros dos nodos tecnológicos y uno más de formación. Una de las misiones del INB es fomentar su interacción con grupos que trabajen en proyectos genómicos y el fomento del uso de herramientas bioinformáticas.

# **CENTRO NACIONAL DE GENÓMICA BACTERIANA Y RED NACIONAL DE GENÓMICA BACTERIANA**

Andrés Moya

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva y Departamento de Genética.  
Universitat de València

El Gobierno Valenciano, a través de su Consejería de Sanidad y, particularmente, la Dirección General de Salud Pública, ha dado el visto bueno a la creación de una iniciativa en genómica bacteriana que hemos denominado Centro Nacional de Genómica Bacteriana (CNGB). Ese visto bueno se traduce en los espacios donde se ubicará el centro, dentro de otro denominado Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), las infraestructuras para la secuenciación y la bioinformática y la plantilla de investigadores y técnicos. El CSISP, que se está construyendo ya, se espera que sea operativo en 2007. No obstante, en el marco de convenios específicos con la Universitat de València para 2005 y 2006, la Consejería de Sanidad ha proporcionado y continuará proporcionando recursos para poder implementar objetivos de investigación del CNGB, aprovechando para ello el capital humano y los recursos del grupo de Genética Evolutiva del Instituto Cavanilles de la Universitat. de València.

Se ha mantenido contactos y reuniones con los representantes oportunos del Ministerio de Educación y Ciencia, del Carlos III y del Ministerio de Sanidad. Por otro lado, la iniciativa está pensada para ser compatible con facilidades ya disponibles, como son, entre otras, el Centro Nacional de Genotipado y el Instituto Nacional de Bioinformática, ambas propiciadas por Genoma España.

El proyecto se gesta como consecuencia de la demanda por parte de los miembros de la Red Nacional de Genómica Bacteriana de una facilidad como la que he mencionado. Hablaré de la citada red, cuya génesis también está estrechamente vinculada a investigadores de nuestra Comunidad.

Presentaré la estructura del centro, sus diferentes áreas, las infraestructuras solicitadas y proyectos iniciales de trabajo.

# LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PROTEÓMICA (SEProt)

Juan J. Calvete

*Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.*



La Sociedad Española de Proteómica (*SEProt*, <http://www2.cbm.uam.es/seprot>) se inscribió en el Registro Nacional de Asociaciones en Diciembre del 2004 con el objetivo de impulsar el desarrollo de la Proteómica en nuestro país, agrupando para ello a investigadores del campo de la Proteómica, usuarios de Servicios de Proteómica, Empresas del sector, y estudiantes interesados en el estudio de los proteomas. Para el cumplimiento de estos fines, la *SEProt* organiza reuniones periódicas que catalicen la discusión y el intercambio de nuevas ideas entre investigadores tanto del ámbito académico como empresarial. El primer Congreso de la *SEProt* se celebró en Córdoba durante los días 14-17 de Febrero del 2005 (<http://www.uco.es/servicios/scai/seprot2005/presentacion.htm>) con asistencia de 350 delegados, incluidos representantes de 17 Sociedades de Proteómica europeas que previamente habían mantenido una reunión de trabajo para sentar las bases de la futura European Proteomics Association (EuPA). El libro de resúmenes (10 conferencias plenarias y 140 paneles) está disponible en la página web de la *SEProt*, y la reseña del congreso se publicó en el número 11 de la revista *Proteomics* (5: 2712-2715; <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jissue/110575701>). Miembros de la Junta Directiva de la *SEProt* han sido elegidos para participar en los Comités de trabajo de EuPA, con lo que la Proteómica española va a estar representada desde el inicio de la Federación Europea de Sociedades de Proteómica. La *SEProt* no es ajena a la necesidad de potenciar las posibles sinergias con otras Sociedades nacionales afines. Así, se ha llegado a un acuerdo con la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular para que un miembro de la Junta Directiva de la *SEProt* co-dirija el Grupo de Genómica y Proteómica de la SEBBM. Además, la *SEProt* es miembro de pleno derecho de la Confederación Española de Sociedades Científicas (COSCE, <http://www.cosce.org>). En Febrero del 2007 se celebrará el 2º Congreso de la *SEProt* en Valencia, en el Auditorio Santiago Grisolia del Museo de Ciencias Principe Felipe (<http://www.fundacioncac.es/cas/fundacion/objetivos.asp>). El congreso va a estar enfocado hacia la Proteómica española y latinoamericana, y está previsto que la conferencia inaugural la dicte John B. Fenn, Premio Nobel de Química del 2002 por "*development of soft ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules*" (<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002>), y primer Socio de Honor de la *SEProt*. Os mantendremos informados del desarrollo de los preparativos del congreso en el portal web que se habilitará al respecto, así como a través del Boletín periódico de la *SEProt* cuyo primer número se editó en Agosto de este año y está disponible en la página web. Ya somos más de 100 socios en la *SEProt*, pero desde luego aún no estamos todos los que deberíamos estar. Recuerda: la *SEProt* somos todos... Contribuye, ¡Hazte socio!

# PRESENTACIÓN DEL ÁREA DE GENÓMICA Y FARMACOPROTEÓMICA Y DEL GRUPO DE FARMACOLOGÍA MOLECULAR DEL CIPF

José María Sánchez-Puelles

*Farmacología Molecular. Centro de Investigación Príncipe Felipe. c/ EP Autopista del Saler, 16.E46013 Valencia (España)*

**El área de Genómica y Farmacoproteómica del CIPF, pretende contribuir a la creación de una Plataforma de Descubrimiento de Fármacos (*Drug Discovery*) con el fin de obtener, caracterizar y desarrollar nuevos compuestos con actividad terapéutica relevante en el área de la Salud Humana. Los procesos de Cribado (*Screening*) permitirán caracterizar inhibidores con actividades fisiológicas relevantes para la enfermedad en estudio y podrán ser posteriormente considerados para su desarrollo preclínico hasta las Fases Clínicas en humanos.**

Los objetivos generales del grupo de **Farmacología Molecular** son el estudio de los mecanismos básicos de control de la fase de expansión *ex vivo* de células troncales adultas, e.g., células troncales neurales (NSCs) y mesenquimales (MSC) de cordón y médula ósea, para:

- La mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la multipotencia/auto-renovación en células troncales adultas en condiciones de hipoxia fisiológica.
- Diseño de metodologías para estudiar los procesos de autorenovación / diferenciación de células madre adultas mediante la búsqueda de moduladores en procesos de cribado.

## **Líneas de Investigación**

### **1.- Identificación de Dianas Farmacológicas en los Mecanismos celulares de Señalización Molecular.**

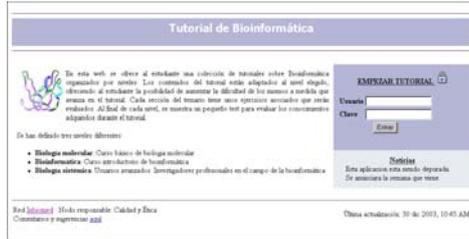
El Factor Inducible por Hipoxia (HIF) es un factor de transcripción heterodimérico con subunidades expresadas constitutivamente (beta) y reguladas por hipoxia (alpha). Existen descritas tres isoformas  $\alpha$  en mamíferos HIF1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  y 3 $\alpha$ . La activación de la kinasa PI3 (PI3K) resulta en una acumulación de HIF y la activación del receptor de insulina activa la cascada PI3K-p42/48, lo que promueve la traducción del mRNA de HIF vía la diana de rapamicina (TOR), agente el cual es bien conocido además por su actividad antiangiogénica. Teniendo en cuenta la multiplicidad de factores en los que HIF está actuando como regulador, nuestra hipótesis es que HIF pudiera estar regulando alguna de las rutas metabólicas que intervienen en la autorenovación /diferenciación de la célula troncal neural y mesenquimal. Estamos llevando a cabo estudios inmunocitoquímicos con marcadores de diferenciación e indiferenciación que, potencialmente, pudieran estar regulados por HIF en líneas de NSCs y MSC. Además, estamos trabajando en la obtención de nuevas herramientas, tanto líneas recombinantes – MSC, líneas neurales y NSCs transfectadas con genes reporteros fusionados a los elementos de respuesta de HIF (HRE) como compuestos de bajo peso molecular, provenientes de las colecciones del CIPF - para analizar la modulación de la expresión de genes regulados por HIF en células troncales adultas.

## 2.- Identificación de Compuestos con Potencial Terapéutico

El objetivo del Grupo de Cribado (*screening*) será la selección de compuestos con actividad biológica en dianas farmacológicas relevantes de enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, inflamación, cáncer, así como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, etc. Para ello nos proponemos la creación de un equipo multidisciplinar en las áreas de Biología y Bioinformática que identifiquen e implementen las dianas terapéuticas en forma de ensayos de alta densidad (*hightrouhput screening*- HTP). Por el número de ensayos será imprescindible la implementación de Sistemas Robotizados que sean capaces de procesar un alto número de muestras en formato de alta densidad. Los ensayos se adaptarán además a sistemas de lectura que permitan la captura directa de los resultados y los cálculos correspondientes para la rápida determinación de las muestras positivas. El tratamiento integrado de los resultados permitirá la agrupación de aquellas moléculas con características biológicas similares. Asimismo, el tratamiento estadístico de los resultados y la aplicación de herramientas de Análisis Grupales (*Cluster Análisis, Principal Component Análisis*) nos permitirán la discriminación de aquellas moléculas con características físico-químicas más apropiadas para los ensayos en modelos animales. Caracterización del modo de acción de los moduladores obtenidos de los ensayos de autorenovación /diferenciación y estudios traslacionales de diferenciación celular en el modelo murino adecuado.



**Figura 1. Arquitectura funcional del sistema**



**Figura 3. Página de Presentación**

**Figura 2. Arquitectura software del sistema**



**Figura 4. Página de Índice**

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado conjuntamente por el proyecto “Diseño, desarrollo y validación de una plataforma informática integrada para la investigación en nutrigenómica” (GV 133/05), financiado por la Generalitat Valenciana, y la red temática “INBIOMED. Plataforma de almacenamiento, integración y análisis de datos clínicos, genéticos, epidemiológicos e imágenes orientada a la investigación sobre patologías” (G03/160), financiada por el Instituto de Salud “Carlos III” - Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

## **Sesión II:**

*“Genómica Funcional”*

# IDENTIFICACIÓN DE GENES DE CÍTRICOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DEL FRUTO A LA INFECCIÓN POR *Penicillium digitatum* MEDIANTE TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO

Alamar S., Sánchez-Torres P., Zacarías L., González-Candelas L., Marcos J.F.

*Departamento de Ciencia de los Alimentos*

*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) – CSIC.*

*Burjassot, España.*

La infección de plantas por patógenos supone graves pérdidas para la agricultura en el mundo. En el caso de los frutos cítricos, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* son los hongos con mayor incidencia, siendo causantes de aproximadamente el 80% de las pérdidas por podredumbres durante la conservación de los mismos. Aunque hay pocos estudios acerca de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de los frutos cítricos a la infección por patógenos, se sabe que la infección por *P. digitatum* provoca un aumento en la producción de etileno, una hormona vegetal implicada en la respuesta global de la planta a la infección.

Hemos utilizado la técnica de la hibridación substractiva mediada por PCR supresivo (SSH) para generar una genoteca de fragmentos de cDNAs enriquecida en genes del fruto que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección por *P. digitatum*. A partir de ella, hemos obtenido una macromatriz conteniendo 1536 clones, incluyendo controles. Hibridaciones de esta matriz con RNA de frutos control, heridos o infectados, así como con muestras tratadas con etileno o con un potente inhibidor de la percepción del etileno, el 1-MCP, han permitido la identificación de clones con expresión diferencial, que se agruparon en diferentes patrones de expresión génica. De todos ellos se secuenciaron 331, identificándose 221 genes únicos que fueron categorizados funcionalmente.

En el marco del proyecto español de genómica funcional de cítricos (CFGP) se ha elaborado una micromatriz con 12672 clones procedentes de 18 genotecas obtenidas a partir de distintos tejidos de la planta en diferentes estadios fisiológicos y en respuesta a diferentes tipos de estrés. Estas matrices se hibridaron con muestras de frutos control, heridos o infectados por *P. digitatum*. Con el fin de aumentar la fiabilidad de los resultados, se emplearon varias réplicas biológicas de cada tipo de muestra, lo que nos permite una clara asignación de genes del fruto que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección. La concordancia entre los resultados obtenidos en las dos aproximaciones confirma la reproducibilidad de los mismos.

# ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACIÓN INTERNA DEL FRUTO DE LOS CÍTRICOS

Manuel Cercós, Guillermo Soler, Manuel Talón

*Centro de Genómica. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada, Valencia.*

Se han examinado mediante hibridación de microarrays de cDNA los cambios de expresión de 7000 genes durante el desarrollo y maduración interna de los frutos de *Citrus clementina* cv. Clementina de Nules, una variedad autoincompatible perteneciente a una especie no climatérica. Se observaron cambios significativos de expresión en 2243 unigenes. La clasificación funcional mostró que los clusters inducidos estaban significativamente enriquecidos en genes codificantes de proteínas reguladoras. Los grupos más abundantes de proteínas reguladoras inducidas fueron las familias NAC, MADS y MYB de factores transcripcionales. En los clusters reprimidos, se observó un enriquecimiento significativo en la categoría funcional de interacción con el ambiente. El mapeo de los datos de expresión génica sobre rutas metabólicas mostró los procesos fisiológicos clave que tienen lugar durante el desarrollo y maduración interna de los frutos de los cítricos. Entre ellos cabe destacar la expansión celular, acumulación de agua y sacarosa, reducción de la acidez, sustitución de pigmentos (acumulación de carotenoides y disminución de antocianinas y flavonoides), disminución de la cantidad de ácido ascórbico y disminución de la cantidad de lípidos.

# TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TRANSGENIC CARRIZO CITRANGE WITH MODIFIED PLANT ARCHITECTURE

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

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

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

Gibberellins (GAs) are growth substances that regulate different physiological processes, including shoot elongation. A direct correlation has been found between final shoot length and the content of active GA in many species. Gibberellin levels are mainly regulated by transcriptional control of gibberellin biosynthesis genes.

The use of higher planting densities and smaller-sized trees is considered essential for viability of citrus production. It has been shown that is possible to change GA levels by modifying GA 20-oxidase enzyme levels (Vidal *et al.*, 2001). We have used this approach to control citrus rootstock Carrizo citrange size. In previous work, Carrizo citrange has been transformed to constitutively express both sense or antisense copies of a citrus *GA 20-oxidase* (Fagoaga *et al.*, 2003).

cDNA microarray techniques have become important tools for the analysis of large-scale gene expression. Their major advantage is that they enable the expression of a large number of genes to be analyzed simultaneously and thus important genes regulating specific stages in the life of the organism under investigation can be identified. A citrus cDNA microarray containing 12672 clones, representing 6875 putative unigenes (Forment *et al.*, 2005) has been used to characterize transgenic Carrizo citrange transcriptome. The genotypes used were the representative sense line 8-23 (taller phenotype) and antisense line 5-4 (dwarf phenotype). Wild type control plants were grown in parallel with transgenic plants. Developing shoots were collected from wild type and transgenic plants and total RNA was extracted. Wild type samples were labelled with Cy3 and transgenic samples with Cy5 and used to hybridize six slides, three biological replicates for each transgenic line. A student's *t* test was performed for each gene between wild type and transgenic plants. We consider genes with a *P* value <0.05 as differentially expressed genes. To reduce the occurrence of false positives, we applied an additional 2-fold expression change for subsequent analysis. We show that expression of a citrus *GA 20-oxidase* in sense or antisense orientation results in changes in gene expression. In this work, we present only the most differentially expressed transcripts and their functional classification.

In order to investigate if differentially expressed genes were GA-inducible, Carrizo citrange developing shoots were cultured with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) or paclobutrazol (PCB) solutions. Northern blot analysis should reveal whether some of the genes investigated show expression change in response to GA or PCB treatment.

-Fagoaga C *et al.* 2003 Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona.

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

-Vidal A *et al.* 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta*, 217: 442-448.

# PREDICCIÓN DE VARIEDADES DE *Citrus clementina* USANDO PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Ancillo<sup>1</sup>, G., Gadea<sup>2</sup>, J., Forment<sup>2</sup> J., Guerri<sup>1</sup>, J. and Navarro<sup>1</sup>, L.

<sup>1</sup>*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera, Km. 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia, Laboratorio de Genómica, Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain*

En los últimos años, los estudios con micromatrices han explotado el hecho de que cada estado biológico concreto, está determinado por la expresión coordinada de una serie de genes diferente. Debido a ello, la aplicación de métodos de entrenamiento supervisado usando perfiles de expresión génica ha supuesto un avance considerable en la investigación del cáncer permitiendo mediante experimentos de predicción de clases la clasificación de muestras desconocidas examinando su perfil de expresión.

El estudio de las diferencias transcripcionales ha sido clave, así mismo, en el contexto de poblaciones naturales, para poner de manifiesto el componente genético en la variabilidad de la expresión génica. Cada especie, cepa o población expresa una serie particular de genes en cada momento.

Para profundizar en el estudio de estas cuestiones en plantas, los cítricos suponen un modelo muy adecuado ya que la práctica totalidad de las variedades de clementina y naranjo dulce se han originado por mutaciones espontáneas en campo que han sido propagadas vegetativamente después de una cuidadosa selección por parte del agricultor. Muchas variedades difieren en determinadas características agronómicas del fruto pero son indistinguibles durante el periodo juvenil y los estadios vegetativos en el adulto. La escasa variabilidad genética existente, hace poco eficiente el uso de marcadores moleculares para identificar variedades.

En este trabajo, hemos usado perfiles de expresión génica para predecir 3 variedades de *Citrus clementina* (Marisol, Clemenules y Hernandina) mediante 2 métodos de entrenamiento supervisado (“Support Vector Machines” y “Prediction Analysis of Microarrays”). Para ello hemos utilizado una micromatriz de cDNA que contiene más de 6500 unigenes diferentes de citrus y que ha sido desarrollada dentro del Proyecto “Genómica Funcional de Cítricos” (<http://genomica.ibmcp.upv.es>). Estas 3 variedades de clementina difieren principalmente en el tiempo de maduración así como otras características agronómicas del fruto, pero son fenotípicamente indistinguibles en los estadios vegetativos del ciclo vital. Nuestros resultados muestran que la variabilidad es dependiente de la variedad y que en condiciones experimentales los métodos de entrenamiento supervisado pueden usarse para predecir la variedad de muestras de clementina desconocidas.

# TRANSCRIPTÓMICA Y METABOLÓMICA DE GLIOMAS

R. Ferrer-Luna<sup>1</sup>, MC. Martínez-Bisbal<sup>1</sup>, D. Monleón<sup>1</sup>, V. Esteve<sup>1</sup>, E. Piñero-Sagredo<sup>1</sup>, B. Martínez-Granados<sup>1</sup>, M. Mata<sup>2</sup>, F.V. Pallardó<sup>2</sup>, B. Celda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Aplicaciones Biofísicas y Biomédicas de la RMN. Departamento de Química Física, UVEG

<sup>2</sup>Unidad Central Investigación de Medicina, UCIM. Facultad de Medicina. UVEG

Algunos de los tumores cerebrales se caracterizan por una elevada agresividad, y escasa respuesta a tratamientos convencionales, por lo general la mayoría de los pacientes acaban sucumbiendo a la enfermedad. La resección quirúrgica del tumor acompañada de tratamiento radioterapéutico, y quimioterapéutico, habitualmente Carmustina, es la estrategia común empleada por los clínicos. El conocimiento metabólico y molecular de los tumores cerebrales permite mejorar el diagnóstico, pronóstico, y tratamiento de estos tumores. Un diagnóstico precoz de estas masas proliferativas es crítico debido a la irremplazable funcionalidad del tejido nervioso y a su accesibilidad limitada.

Los gliomas se caracterizan por su elevada heterogeneidad lo cual dificulta el diagnóstico morfológico de tumores de alto grado (elevada agresividad) y de los tumores de bajo grado (mejor pronóstico). El objetivo de esta comunicación es presentar la gradación de los gliomas desde una visión molecular complementaria y aditiva a la morfológica tradicional en anatomía-patológica.

Los análisis de espectroscopia comprendieron 15 Astrocitomas, 10 Astrocitomas Anaplásicos, y 26 Glioblastomas. Los análisis de expresión comprendieron 20 pacientes con GBM, Astrocitomas, Oligodendrogliomas, Meningiomas y Metástasis, estos mismos pacientes también contaron con estudios de metabolómica in vivo (Espectroscopia de Resonancia Magnética, ERM), previos a la resección.

**Adquisición de datos metabólicos In vivo.** La ERM permite la obtención de perfiles metabólicos e imágenes moleculares de modo no invasivo, pudiendo denominarse por analogía como “biopsias no cruentas”.

El estudio fue realizado en una unidad de 1.5T Philips Gyroscan Intera. El protocolo empleado para la determinación del grado de gliomas incluye: SV (TE 31 y 136ms) en la lesión con TR de 2000 ms. El voxel es localizado en la región de mayor celularidad según las imágenes de colina (Cho) obtenidas mediante CSI (TE 272 ms).

**Adquisición de datos genómicos.** La masa tumoral de partida osciló entre 15-25 mg. La extracción y purificación del RNA se realizó con métodos estándar, La pureza e integridad del RNA se garantizó por análisis espectrocópico de los ratios A260/A280 (entre 1.9 - 2.1) y 28S/ 18S (mayor que 1.1). El empleo de un chip pangénomico de 47.000 transcritos y variantes, y 38.500 genes bien caracterizados, permitió un análisis de expresión del genoma completo. La reproducibilidad y exactitud fueron garantizadas por el tipo de plataforma empleada HG-U133Plus2.0.

Los análisis metabólicos y transcriptómicos de los tumores cerebrales permitieron tanto la diferenciación entre tipos de tumores cerebrales como la gradación molecular de los gliomas. En ambas técnicas se encontraron diferencias significativas entre tumores de alto grado y bajo grado. Estos resultados sugieren la viabilidad de una caracterización molecular, que adicionalmente aporta un conocimiento mayor de la biología del tumor. Esto posibilita el estudio de dianas farmacológicas, para estrategias terapéuticas. Asimismo, este tipo de estudio complementa los resultados de anatomía patológica mejorando el diagnóstico de dicho tipo de tumores.

# GENE EXPRESSION STRATEGIES IN THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

José García-Martínez<sup>1</sup>, Fernando González<sup>2</sup> and José E. Pérez-Ortín<sup>1,3</sup>

(1) Sección de Chips de DNA-SCSIE; (2) Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva and (3) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València. C/ Dr. Moliner 50. E-46100 Burjassot. Spain.

Eukaryotic gene expression is regulated by a number of mechanisms acting at different levels, from DNA to mature protein. Most studies of gene regulation have been done considering the mRNA level of individual genes. However, it has been described that in many cases other steps such as transcription rate, mRNA stability, mRNA processing among others, can be very relevant as well. In the last few years the use of DNA chips has extended the evaluation of mRNA amounts to the genome level. DNA chips can also be used to evaluate other gene expression parameters. In fact, we have developed a method that uses nylon macroarrays and *in vivo* radioactive labelling of nascent RNA to quantify transcription rates (TR), mRNA levels and mRNA half-lives for all the *S. cerevisiae* genes: the Genomic Run On (GRO) method (García-Martínez et al., 2004).

Similarly, other authors have developed high-throughput methods to evaluate mRNAs half-lives, translation rates (TLR), and protein amounts in yeast cells (Beyer et al., 2004; Greenbaum et al., 2003). We have used data for translation rates and protein amounts to calculate protein half-lives. In this way, for the first time, all the six parameters characterising gene expression are known for a eukaryotic cell in a definite physiological state (exponential growth in glucose medium). With all these data, we have analysed how every gene uses the transcription and translation rates and the mRNA and protein stabilities to obtain defined amounts of mRNA and protein. We obtained a set of absolute values for the six parameters (mRNA and protein amounts in molecules per cell, TR and TLR in molecules per minute, and mRNA and protein half-lives in minutes) for a total of 3138 yeast genes. The data were transformed in relative hierarchical values (percentiles) for each parameter (to prevent large scale differences effects among them). Cluster analysis (SOTA included in GEPAS v1.1 from the CNIO Bioinformatic Unit) was used to establish the relationships between yeast genes. We have found that genes participating in similar functions and, especially, those encoding subunits of macromolecular complexes (such as ribosome, proteasome, etc) tend to have similar values, (and similar relative profiles) for the different parameters of gene expression and, consequently, appear grouped in the same or closely related clusters in the SOTA tree. Our analyses show that eukaryotic cells use a variety of strategies to modulate gene expression depending on the function(s) of the corresponding products.

## References:

- García-Martínez, J.; Aranda, A, and Pérez-Ortín, J.E. (2004). Mol. Cell. 15: 303-313.  
Beyer, A. et al. (2004). Mol. Cell. Proteom. 3: 1083-1092.  
Greenbaum D.; Colangelo, C.; Williams, K. and Gerstein, M. (2003). Genome Biol. 4: 117.

**Presentación comercial:**

*“Genómica Funcional”*

## **BI CONSULTING: “APOYO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA MEDIANTE EL ASESORAMIENTO EN MATERIA DE ESTRATEGIAS DE FINANCIACIÓN PÚBLICA”**

La Unión Europea en general, y nuestro país en particular, están todavía muy rezagados en comparación con EEUU y Japón, en el aspecto de las inversiones en I+D+i. En la actualidad, **nuestro país destina el 0.96% del PIB a gastos en I+D**, frente al 1.9% de media en la UE, o el 2.7% y 2.9% en EEUU y Japón, respectivamente.

Uno de los objetivos propuestos en la última Cumbre Europea, es el llegar al **3% en el 2010**. Para alcanzar esta media en la Unión Europea, cada país miembro deberá realizar su aportación. En este sentido, España deberá realizar un esfuerzo superior, por ser uno de los países de la Unión Europea que menos invierten en I+D.

A tal efecto, desde BI Consulting, se pretende **impulsar y fomentar el I+D+i desarrollado en nuestro país mediante el abanico de oportunidades en materia de subvención, financiación en condiciones preferenciales y deducciones fiscales** que la administración pública pone a disposición de las empresas y entidades españolas.

De manera general y de forma independiente, una empresa puede obtener hasta un **70% de subvención neta equivalente del gasto e inversión asociados a un proyecto de Investigación** y, por otra parte, podría aplicarse una **deducción neta que fluctúa entre el 50% y el 30%** (sin tener en cuenta deducciones adicionales) **del gasto total en I+D incurrido** en un ejercicio.

Con objeto de facilitar y fomentar el aprovechamiento de estas oportunidades por parte de las empresas y entidades, nuestra empresa ha desarrollado las herramientas de diagnóstico e identificación necesarias en materia de I+D y ha diseñado una metodología, en base a la experiencia, con los siguientes **objetivos fundamentales**:

- i. **Optimizar, Maximizar y Canalizar el apoyo público al I+D+i** hasta las empresas y entidades.
- ii. **Minimizar el uso de recursos** por parte de la empresa o entidades para la preparación de expedientes.
- iii. **Sistematizar el I+D+i** desarrollado, fomentando la recurrencia de las empresas con iniciativas investigadoras.

Nuestra empresa está presente en gran variedad de sectores (químico, farmacéutico, medicina, alimentación, automóvil, etc.) con clientes líderes en su sector a nivel mundial, obteniendo con todos ellos resultados crecientes año a año.

Es por ello, que desde BI Consulting creemos fundamental nuestra labor de informar, mediante esta y otras jornadas de divulgación científica, a las entidades o empresas con fuerte carácter investigador de las oportunidades existentes, así como identificar y establecer áreas de colaboración con el principal objeto de incrementar el apoyo a proyectos de Investigación y fomentar el crecimiento de la investigación y desarrollo a nivel europeo.

## **Sesión III:**

*“Genómica comparada”*

## **LABORATORIO DE ALTO RENDIMIENTO PARA SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS**

S. Blesa, ML Mansego, AB García-García, V. González, FJ Chaves

*Fundación de Investigación Hospital Clínico Universitario de Valencia.*

Debido al desarrollo de diferentes proyectos de investigación de nuestro grupo y las grandes posibilidades que brindan las técnicas de alto rendimiento para el estudio de polimorfismos, secuencias y otros análisis genéticos nuestro grupo de investigación junto con la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia ha desarrollado recientemente un Laboratorio de Estudios Genéticos basado en sistemas de alto rendimiento.

Nuestro laboratorio permite:

- El estudio a gran escala de polimorfismos mediante los sistemas SNPlex, SNAPShot y LightTyper que nos permitirían obtener más de 120.000 datos de polimorfismos al día.
- Análisis de unas 1000 secuenciaciones al día.
- Análisis de unas 1000 reacciones de PCR cuantitativo al día.

Nuestro Grupo de Investigación mediante diferentes colaboraciones está aplicando estos métodos en diferentes estudios y en los cuales ya tenemos los primeros resultados:

- Genes y variaciones de los mismos implicados en enfermedades multifactoriales y en monogenéticas.
- Alteraciones en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en enfermedades de alto riesgo cardiovascular.

En función de los primeros resultados obtenidos se puede decir que la metodología utilizada y la infraestructura desarrolla son de gran utilidad para el desarrollo de diferentes estudios genéticos. Además, debido a la gran capacidad de procesamiento de muestras, este laboratorio puede desarrollar este tipo de estudios para otros grupos que estén interesados en estudios de polimorfismos, secuenciación y PCR cuantitativa.

# **APLICACIÓN DEL ESTUDIO EVOLUTIVO DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN ENFERMEDADES**

Toni Gabaldón

*Bioinformatics Department – Centro de Investigación Príncipe Felipe. ([tgabaldon@cipf.es](mailto:tgabaldon@cipf.es))*

La mitocondria es un importante orgánulo de origen endosimbiótico que participa, además de en la síntesis de ATP, en numerosos procesos celulares. La disfunción de alguna de sus rutas suele ocasionar graves enfermedades que afectan, principalmente, a los tejidos nervioso y muscular. Mediante técnicas de filogenómica y genómica comparativa desarrollamos un estudio evolutivo del proteoma mitocondrial. A partir de la reconstrucción del metabolismo del ancestro mitocondrial, trazamos la evolución de diferentes rutas a lo largo de los diferentes linajes eucarióticos. La identificación de grupos de proteínas que evolucionaron de forma coordinada nos permite predecir la función de algunas de ellas. Varios resultados experimentales han confirmado ya algunas de nuestras predicciones que conciernen a nuevos genes implicados en enfermedades mitocondriales cuyo origen era, hasta ahora, desconocido.

## **GENOME REDUCTION IN BLATTABACTERIA, THE ENDOSYMBIONTS OF COCKROACHES**

*Neef, Alexander; López-Sánchez, María José; Latorre, Amparo and Moya, Andrés*

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Grupo Genética Evolutiva, Universitat de Valencia; Apartado Postal 22085, 46071 Valencia

Blattabacteria are intracellular endosymbionts found specifically in the abdominal fat body of cockroaches. The symbiosis is considered as mutually obligatory although the function of the blattabacteria is yet unknown. Blattabacteria are members of the phylum Bacteroidetes (formerly called CFB phylum) and the genus Blattabacterium is belonging to the class Flavobacteria constituting therein an own family. The genomes of six insect endosymbionts, all members of the gamma-proteobacteria, have been already completely sequenced. The gathered information reveals for all of them a drastic genome size reduction in comparison with their respective free living relatives. The gene contents found in these symbionts have confirmed the eminent role of the bacteria for the nutrition of the hosts like postulated previously. Therefore, we hope that genomic studies of blattabacteria may disclose an idea of their function for the cockroaches, but also deliver general insights on the evolutionary constraints for obligate intracellular bacteria. Here, genome sizes of three different blattabacteria were determined using pulse field gel electrophoresis.

Additionally, a shot-gun approach sequencing project of the complete genome of the endosymbiont of *Blattella germanica* has been started.

Determined genome sizes for the endosymbionts from *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, and *Blatta orientalis* were highly congruent and all in the size range of about 650 kb. Despite the identical genome sizes restriction patterns were considerably distinct for the three symbionts and showed a species-specific outline.

In the moment, this is the only known genome project for a non-proteobacterial insect endosymbiont. Like the gamma-proteobacterial endosymbionts blattabacteria possess a highly reduced genome compared with free-living relatives. The genome sequence is expected to reveal the function(s) of the blattabacteria for the cockroaches and might in future support the improvement of pest control strategies.

## **Sesión IV:**

*“Proteómica”*

# INDUCCIÓN TEMPRANA DE COMPONENTES DEL COMPLEMENTO EN LA PARED ARTERIAL EN RESPUESTA A HIPERCOLESTEROLEMIA Y POSIBLE PAPEL PATOLÓGICO

Castro, C\*; Verdeguer\*, F; Kuviccek, M\*; Pla, D;\* Pocoví, M<sup>†</sup>; Calvete, J. J.#; Andrés, V.\*

\* *Laboratorio de Biología Vasculare y #Laboratorio de Proteómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia,*

<sup>†</sup> *Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza*

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo principal en desarrollo de la placa de ateroma, un proceso de naturaleza multifactorial. Con el fin de estudiar los cambios en la expresión de genes sensibles a la hipercolesterolemia utilizamos la técnica de microarrays de cDNA de alta densidad en aorta de ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE -/-), un modelo bien establecido de arteriosclerosis experimental. Los animales recibieron una dieta control o aterogénica durante dos o siete días y fueron sacrificados para obtener RNA total del cayado aórtico. Se prepararon cRNA biotinilados y se hibridaron en microarrays Affymetrix MOE430 de ratón. Las imágenes se analizaron con GeneChip Expression Análisis (Affymetrix Microarray Suite 5.0). Tras una rigurosa selección identificamos 311 genes que estaban regulados por la dieta hipercolesterolémica al alza o a la baja en el cayado aórtico. Un número elevado de estos genes regulados en fases tempranas de hipercolesterolemia están funcionalmente relacionados y participan en procesos diversos, tales como respuesta inmune, metabolismo, proliferación y adhesión celular, transcripción génica, transporte, y activación del complemento (**Castro C**, Campistol JM, Baretino D, and Andrés V. Transcriptional profiling of early onset diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Frontiers in Bioscience* 2005. 10:1932-45).

Basados en estos resultados, hemos analizado con detalle la regulación de los genes que participan en la activación del complemento, tanto por la vía clásica (C1q/C4) como por la vía alternativa (C3). La inducción del mRNA se verificó por técnicas de RT-PCR cuantitativa. Además, comprobamos mediante inmunohistoquímica una fuerte inducción de C3 y C1q en la pared arterial de ratones hipercolesterolémicos antes del desarrollo del ateroma. Finalmente, mediante técnicas de proteómica y ELISA detectamos un aumento de componentes del complemento en el suero de pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Con el fin de profundizar en el papel de la cascada del complemento en la fisiopatología vascular, hemos estudiado su efecto en cultivos primarios de miocitos lisos vasculares (MLVs). Nuestros resultados demuestran que C3/C3a y C4 promueven la proliferación de las MLVs. Además observamos que C3/C3a inducen la activación de las MAPK/Erk a través de receptores acoplados a proteína G, y el efecto mitogénico de C3/C3a se bloquea en presencia de inhibidores de MAPK/Erk. Estos hallazgos revelan un nuevo mecanismo que podría contribuir al aumento de la proliferación celular característica de los estados iniciales del proceso aterosclerótico, e identifican diversas proteínas de la cascada del complemento como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de arteriosclerosis.

# GENÓMICA Y PROTEÓMICA DE VENENOS DE SERPIENTES: MECANISMOS DE EVOLUCIÓN DE LAS DISINTEGRINAS

Paula Juárez<sup>1</sup>, Libia Sanz<sup>1</sup>, Simon Wagstaff<sup>2</sup>, Rob Harrison<sup>2</sup> & Juan J. Calvete<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.

<sup>2</sup> Liverpool School of Tropical Medicine, Licerpool, UK.

Los venenos de serpientes *Viperinae* y *Crotalinae* (víboras y serpientes de cascabel) contienen proteínas que afectan a la cascada de coagulación, al sistema hemostático y a la reparación de tejidos, que se agrupan en unas pocas familias estructurales incluyendo enzimas (serinproteasas, metaloproteasas dependientes de  $Zn^{2+}$ , fosfolipasas  $A_2$ , L-amino ácido oxidasa) y proteínas sin actividad enzimática (miotoxinas, proteínas similares a lectinas dependientes de  $Ca^{2+}$ , disintegrinas). Las disintegrinas son productos del procesamiento proteolítico de precursores formados por a) un péptido señal, un pro-péptido, y los dominios metaloproteasa y disintegrina o b) un péptido señal, un pro-péptido corto y un dominio disintegrina. Las disintegrinas, proteínas de 40-100 aminoácidos que antagonizan las funciones de los receptores de adhesión celular de las integrinas  $\alpha_1$  y  $\alpha_3$ , pueden clasificarse de acuerdo a la longitud de su cadena polipeptídica y su contenido en SS en monoméricas PII cortas (~50 AA, 4 SS), medias (~70 AA, 6 SS) largas (~83 AA, 7 SS) y PIII (~100 AA, 8 SS y un dominio C-terminal rico en cisteínas), y diméricas (2 cadenas de ~65 AA con 4 SS intracatenarios y 2 SS intercatenarios). En nuestro laboratorio estamos investigando el mecanismo de la diversificación estructural y funcional de las disintegrinas, habiendo propuesto un modelo de evolución basado en la pérdida sucesiva de enlaces disulfuro [1]. Ahora, mediante técnicas de Biología Molecular, hemos analizado el transcriptoma de las glándulas de veneno de *Echis ocellatus* (EO) y *Bitis arietans* (BA). Los cDNAs que codifican subunidades de disintegrinas diméricas son del tipo corto (a), sugiriendo que los precursores con péptido señal, pro-péptido corto y dominio disintegrina son más abundantes que lo anticipado y quizás correspondan a las estructuras canónicas. Además, describimos dos precursores que codifican para la misma disintegrina corta, *ocellatusina*, en el veneno de EO. Ambos contienen una mutación Cys->Y que impide la formación de dímeros y sugieren una ruta evolutiva para la emergencia de las disintegrinas monoméricas cortas. En BA presentamos un intermediario de la ruta evolutiva de las disintegrinas PIII a las PII, el cual no contiene el dominio rico en Cys conservado en las PIII. La composición proteica de los venenos se analizó mediante una estrategia proteómica [2] que incluye RP-HPLC, secuenciación N-terminal, SDS-PAGE, huella peptídica por MALDI-TOF y secuenciación de iones por MS/MS. Los resultados corroboran y amplían el modelo propuesto de evolución de las disintegrinas basado en ingeniería de enlaces disulfuro. Además, la caracterización de mensajeros no expresados en el veneno indica la existencia de un potencial genómico superior al proteómico, una especie de "fondos reservados" para la adaptación por evolución acelerada a ecosistemas cambiantes.

- [1] Calvete, J.J., Moreno-Murciano, M.P., Theakston, R.D.G., Kisiel, D.G., Marcinkiewicz, C. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.* **372**, 725-734.
- [2] Juárez, P., Sanz, L. and Calvete, J.J. (2004) Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *PROTEOMICS* **4**, 327-338.

# **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN/MODIFICACIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

Manuel M. Sánchez del Pino

*Centro de Investigación Príncipe Felipe. Av. Autopista del Saler, 16. 46013 Valencia  
Phone +34-963289680; XT 1301. FAX +34-963289701. e-mail: mspino@cipf.es*

El análisis comparativo de expresión de proteínas es de gran importancia en biología y biomedicina. De hecho, dos de las metodologías de reciente desarrollo más importantes, como son la genómica y la proteómica, están dirigidas fundamentalmente a la realización de este tipo de análisis. La estrategia básica en proteómica es la separación de péptidos o proteínas, detección de diferencias e identificación de las mismas. Si bien la identificación de proteínas se realiza fundamentalmente mediante espectrometría de masas, en la separación previa se emplean aproximaciones experimentales más variadas. La electroforesis bidimensional, pese a sus limitaciones, es el procedimiento más comúnmente utilizado para separar proteínas. Algunas de sus ventajas y la información que proporciona, comparada con metodologías alternativas, hacen difícil su sustitución en la actualidad. Además, avances recientes eliminan o reducen algunos de los inconvenientes convirtiendo la electroforesis bidimensional en una técnica robusta, reproducible y fiable para el estudio de expresión/modificación diferencial. Presentamos, de manera comparativa, algunos de estos avances y ventajas utilizando como ejemplo un modelo de cardiopatía hipertensiva en rata.

# PROTEÓMICA DEL LCR EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

E. Piñero<sup>1</sup>, V. Esteve<sup>1</sup>, MC. Martínez-Bisbal<sup>1</sup>, D. Monleón<sup>1</sup>, B. Martínez-Granados<sup>1</sup>, R. Ferrer<sup>1</sup>, Bonaventura Casanova<sup>+</sup>, Francisco Coret<sup>#</sup>, B. Celda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Aplicaciones Biofísicas y Biomédicas de la RMN, Depto. Química Física, Universitat de Valencia;* <sup>+</sup>*Hospital La Fe (Valencia);* <sup>#</sup>*Hospital Clínico Universitario*

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria autoinmune desmielinizante cuya etiología es todavía desconocida debido a su origen multifactorial, compuesta de una predisposición genética y factores ambientales desconocidos que originan alteraciones en la respuesta inmune produciendo finalmente las placas desmielinizantes características de esta enfermedad y los correspondientes procesos clínicos.

Una de las aplicaciones de la proteómica permite identificar las modificaciones en los niveles de expresión de proteínas en diversas patologías como EM. Estas alteraciones en el perfil proteómico pueden proporcionar una serie de biomarcadores utilizados para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad, para diferenciar el estadio en el que se encuentra el enfermo, proveer información directa del origen molecular de la enfermedad o también para revelar dianas para su tratamiento farmacológico. De esta forma se complementa y amplía un proyecto global de EM en el que se incluyen, además de la proteómica, el estudio del metabolismo in vivo mediante imágenes y espectroscopia de resonancia magnética, donde algunas señales muestran variaciones en intensidad y en consecuencia en la composición metabólica. Estos cambios han permitido identificar alteraciones metabólicas en pacientes de EM en su fase preliminar.

El diseño e implementación de protocolos de espectrometría de masas para la obtención del perfil de proteínas en muestras intactas de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM para su comparación con muestras de LCR de pacientes control con la finalidad de encontrar posibles biomarcadores útiles para el diagnóstico y el pronóstico de esta enfermedad.

Se está desarrollando la puesta a punto de la espectrometría de masas MALDI-TOF (Reflex IV de Bruker) para la determinación del perfil proteico en muestras intactas de LCR. Se han ensayado varias matrices (Ácido Sinapínico,  $\alpha$ -cianohidroxicinámico, DHAP, Ácido Ferúlico) a distintas concentraciones y con distintos disolventes para determinar la que proporciona una mayor resolución e intensidad de las señales y así, desarrollar métodos que permitan la preparación de la placa de una forma automatizada. Por otra parte se han utilizado diferentes técnicas de separación de proteínas para incrementar la señal producida por las proteínas menos abundantes que pueden quedar enmascaradas por las más abundantes.

También se han realizado las medidas de 25 muestras de LCR de pacientes con EM (6 primaria progresiva, 7 remitente-recurrente, 7 secundaria progresiva y 5 Síndrome Clínico Aislado) y de 5 muestras de controles sanos mediante ProteinChip de CypherGen determinando las masas moleculares de las proteínas y péptidos por espectroscopia de masas SELDI-TOF. Las placas utilizadas para estos experimentos separan las proteínas en función de la afinidad metálica (IMAC30 Ni<sup>2+</sup>), intercambio catiónico (CM10) e hidrofobicidad (H50), en todas se probaron como matrices el ácido sinapínico y el  $\alpha$ -cianohidroxicinámico.

La puesta a punto del MALDI-TOF nos ha permitido comparar entre las matrices utilizadas, las concentraciones y los disolventes empleados y de este modo determinar cual es el diseño que proporciona una mayor resolución de los picos y una relación señal-ruido lo más alta posible.

Las superficies de retención química usada en nuestros experimentos mediante ProteinChip permitieron la detección de aproximadamente 200 proteínas de la misma muestra en un intervalo de masas moleculares de 3-30 KDa. Aunque el número de muestras analizadas es todavía reducido, podemos observar diferencias significativas en las señales de algunas de las proteínas detectadas tanto en pacientes control como en los diferentes estadios de la enfermedad. De esta forma para cada posible grupo de comparación analizado seleccionamos una variedad de marcadores potenciales que necesitarán ser validados con una serie más grande de muestras en un número de condiciones más reducido.

# Posters

## GENES DE *Citrus ssp.* INDUCIDOS POR ESTRÉS HÍDRICO

J. Gimeno<sup>1</sup>, J. Santiago<sup>1</sup>, J. Forment<sup>1</sup>, J. Gadea<sup>1</sup>, M.A. Martínez<sup>1</sup>, M. Talón<sup>2</sup>, R. Serrano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-C.S.I.C. Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Náquera, Km. 4,5 46113 Moncada

Como parte del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP), estamos identificando genes de cítricos inducidos por estrés hídrico. Se han construido dos bibliotecas de cDNA sustraído (estrés menos control) a partir de hojas y raíces de *Citrus clementina* cv. *Clemenules* and *Citrus reshni*, respectivamente. Además, se han generado unas 2200 ESTs que corresponden a 1600 unigenes. Un gran número de genes (40%) no tiene homología con las secuencias de las bases de datos públicas y pueden corresponder a genes específicos de cítricos. Los resultados de un experimento preliminar indican que alrededor de un tercio de los clones procedentes de las bibliotecas de sustracción están inducidos por estrés hídrico. 1500 ESTs procedentes de estas bibliotecas han sido incluidas en el primer microarray del CFGP, el cual contiene 13000 ESTs procedentes de todas las bibliotecas incluidas en el proyecto. Además se ha realizado un experimento de microarray utilizando este microarray de cítricos generado por el servicio de Genómica del IBMCP para el CFGP.

# LAS LECITINAS HCA y HML AISLADAS DE LAS ALGAS ROJAS MARINAS *Hypnea cervicornis* e *Hypnea musciformis* DEFINEN UNA NUEVA FAMILIA DE PROTEÍNAS

Celso S. Nagano<sup>1</sup>, Henri Debray<sup>2</sup>, Kyria S. Nascimento<sup>3</sup>, Vicente P.T. Pinto<sup>3</sup>, Benildo S. Cavada<sup>3</sup>, Alexandre H. Sampaio<sup>3</sup>, Silvana Saker-Sampaio<sup>3</sup>, Wladimir R. L. Farias<sup>3</sup>, Francisca Gallego del Sol<sup>1</sup> & Juan. J Calvete<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C.

<sup>2</sup> Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, Francia

<sup>3</sup> Universidade Federal do Ceará, Fortaleza Brasil.

Las interacciones moleculares basadas en el reconocimiento entre proteínas y carbohidratos juegan un papel clave en numerosos procesos biológicos debido al enorme potencial codificador de información biológica de las estructuras de los glicanos en comparación con macromoléculas lineales como las proteínas y los ácidos nucleicos. El reconocimiento de carbohidratos ha surgido por evolución convergente en lectinas de organismos de toda la escala evolutiva y, debido a su exquisita selectividad de unión a sacáridos, son preciadas herramientas en bioquímica y biotecnología. Las lectinas mejor estudiadas son las de vegetales superiores y animales. Por contra, las lectinas de algas marinas han sido poco estudiadas. Hemos caracterizado las lectinas HCA y HML de las algas rojas *Hypnea cervicornis* e *Hypnea musciformis*. de la costa atlántica de Brasil. HCA y HML reconocen epítopos GalNAc/Gal en O-glicanos y Fuc(α1-6)GlcNAc en N-glicanos complejos. Las estructuras primarias fueron determinadas mediante secuenciación de Edman y espectrometría de masas ESI-Qtrap de los N-terminales bloqueados. Ambas lectinas consisten en una mezcla de una cadena de 90 aminoácidos, incluyendo 7 S-S intracatenarios, y fragmentos 1-50 y 51-90 (estructuralmente homólogos) enlazados por disulfuro (S-S). Las secuencias de HCA y HML son 80% similares entre si pero no presentan similitud ni de secuencia ni del espaciamiento de cisteínas con otras proteínas. Ello sugiere que HCA y HML representan los primeros miembros de una nueva familia de proteínas. Los dominios N- y C-terminal presentan 6 cisteínas homólogas y cada uno de ellos posee además una cisteína única, sugiriendo la existencia de tres S-S intradominio y un S-S interdominio. Por equilibrio de sedimentación, HCA y HML se comportan como proteínas monoméricas en disoluciones de pH en el rango 4-9. Se han obtenido cristales de celdilla ortorrómbica P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> de HML que difractan hasta 2.4Å de resolución. La inexistencia de un modelo molecular hace necesario recurrir a técnicas de MIR o MAD para resolver la estructura de esta lectina paradigma de una nueva familia de proteínas.

# **PROTEIN CHANGES PRODUCED IN THE FLAVEDO OF MANDARIN FRUITS IN RESPONSE TO LOW TEMPERATURES. CHILLING INJURY DEVELOPMENT IN ‘FORTUNE’**

C. Pons (1), E. d’Oliveira (2), J.J. Calvete (3), J. Forment (1) and A. Granell (1)

*(1) IBMCP, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. CSIC. Valencia. Spain*

*(2) Plataforma de proteómica, Parc Científic de Barcelona. UB. Barcelona. Spain*

*(3) IBV, Instituto de Biomedicina de Valencia. CSIC. Valencia. Spain*

Exposure to cold induces local necrosis in the rind of some varieties of citrus fruit. In the case of mandarins, most of the Clementine types are tolerant to chilling temperatures (0-12°C). However, the flavedo of some Clementine hybrids, such as ‘Fortune’ (F) and ‘Encore’ is injured upon extended exposure to chilling temperatures. Analyses of transcriptome changes in ‘Fortune’ (chill sensitive) and ‘Hernandine’ (H, chill tolerant), has allowed us to get a broad insight into the response of the flavedo to low temperatures (LT). Results at the transcriptome level suggest that LT affects energy production, homeostasis and structure protection systems. Analyses indicated that probably the molecular responses produced at 12°C are either opposite to or less accused than those occurring at 2°C. They also suggested that chilling injury in the sensitive variety may develop as a result of a delay in the activation of a protective molecular response mechanism.

During our study we found that changes in mRNA levels probably do not reflect well what is happening down the line in all cases. Genes involved in post-translational regulation mechanisms and several proteins involved in translation are affected by LT. This prompted us to characterize the protein complement and analyze the response of the flavedo to LT at the proteome level. For this purpose, protein extracts from F and H at 0, 14, and 28 days at 2 and 12°C were resolved by their pI and molecular weight in 2D gels (IEF followed by SDS-PAGE). The analysis of 2D protein patterns showed that most proteins are present in all samples, what indicated that the main protein components of the flavedo are stable even after 2-3 weeks. A closer inspection of 2D results has permitting to identify the trend of specific proteins that do change in response to LT. A selected number of proteins are picked from the gels to obtain the tryptic peptide fingerprint and peptide sequences by mass spectroscopy MALDI-TOF/TOF. Protein functions will assign by comparing with MASCOT engine fingerprints against in-silico trypsin NCBI and citrus digested proteins. Comparative analysis at the mRNA and protein level is helping us to define the macromolecular composition of the flavedo, to identify possible post-transcriptional regulation points and protein modifications

# **ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LOS FRUTOS DE CLEMENTINA DE NULES Y FORTUNE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO UTILIZANDO MICROMATRICES**

Royo C, Pons, C, Pérez-Amador MA, Lafuente MT\*, Zacarías L\*, Granell A

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. CSIC-UPV. Valencia.*

*\* Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia.*

El tratamiento de cuarentena simple o doble es un requisito obligatorio para la exportación de frutos cítricos, que tiene por objeto evitar la entrada de organismos no deseados procedentes de otros países. Ello implica someter los frutos a temperaturas de 1-2°C durante 2 ó 4 semanas, que es el tiempo necesario para eliminar de forma eficiente, entre otras, las larvas de la mosca del Mediterráneo. Este tratamiento puede alterar la calidad de los frutos, ya que algunas variedades, como Clementina Fortune, son especialmente proclives a desarrollar daños en la piel durante la exposición prolongada a bajas temperaturas. Con objeto de averiguar los mecanismos de respuesta/adaptación al frío que desarrollan las células del flavedo (parte externa coloreada del fruto) hemos iniciado el estudio de los cambios en la expresión génica que ocurren por la exposición de los frutos de Clementina de Nules, variedad tolerante, y Clementina Fortune, sensible, a las bajas temperaturas requeridas por los protocolos de cuarentena. Para ello, hemos utilizado la micromatriz generada en el Proyecto de Genómica de Cítricos (CFGP). Ésta contiene 12672 ESTs, correspondientes a 6875 unigenes, de los cuales 1344 ESTs proceden de una genoteca de cDNA de flavedo de frutos de Clementina de Nules almacenados 7 y 21 días a 2 °C. Se analizó el transcriptoma representado en la micromatriz en el caso de frutos de Clementina de Nules y Fortune almacenados a 2°C durante diferentes periodos de tiempo, desde exposiciones breves hasta las 8 semanas. Pretendemos mediante el análisis bioinformático de los resultados obtenidos, identificar cuales son los componentes del programa genético molecular que explique por qué una variedad es sensible y la otra tolerante al estrés por bajas temperaturas. Por otra parte, la identificación de la naturaleza de los genes implicados en las diferentes etapas de la respuesta al frío puede ayudar a identificar posibles dianas a las que dirigir programas de mejora asistida para mejorar la calidad de los frutos y su resistencia a estas condiciones de estrés.

## **IN SILICO AND EXPERIMENTAL STUDY OF CLOSELY PACKED TANDEMLY ORIENTED ORFS IN *S. CEREVISIAE*.**

Vicent Pelechano<sup>1</sup>, José García-Martínez<sup>2</sup>, y José E. Pérez-Ortín<sup>1,2</sup>

(1); *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de València.* (2) *Sección de Chips de DNA-SCSIE. C/ Dr. Moliner 50. E-46100 Burjassot. Spain*

The genome of the microbial eukaryotes is very compact. This is, probably, due to an evolutive pressure to reduce the effort in DNA replication. The need for a compact genome forces genes and other chromosomal elements to pack closely. *S. cerevisiae* is the best eukaryotic model organism for genome organization. It has 12 Mb and almost 6000 ORFs. The distance between two ORFs is, on average, very short and dependent on the ORF orientation (Dujon, 1996). The representation of the inter-ORFs distances is similar to a log-normal distribution. It seems to be a minimum distance between adjacent ORFs that depends on the relative orientation of the two ORFs. We hypothesized that there is a minimum length where the elements necessary to start and finish the transcription should be placed. We chose the 146 ORFs pairs oriented in the same direction whose distance is under 150 bp to test this hypothesis.

The existence of gene pairs which ORFs are placed closer than 150 bp may respond to different reasons. First, the two annotated ORFs may correspond, in fact, to a single ORF spliced in two by a sequencing error. Second, there may be a single functional ORF in other species or strain that has been mutated in the reference strain. Third, the two ORFs may be transcribed together in the same mRNA molecule forming a “dicistronic” messenger. Fourth, the two ORFs could be fused by an intron that merges the two apparent ORFs into a single gene. Finally, one of the ORFs of the pair may be not a real gene.

Using the sinteny results of Kellis et al. (2003) and Cliften et al. (2003) we concluded that the majority of the pairs (60%) could be explained because one of the two ORFs is not a real gene. Moreover, there are 11% of pairs where the start or stop codon was erroneously annotated and 8% where the two ORFs correspond to a single ORF in other species. There are still 30 ORFs pairs that seem to be actual genes. We selected 7 ORFs pairs that look more like to be real ones, because they were functionally characterized. We do not detect annotated sequencing errors in any pair. By RT-PCR analysis of the resulting mRNAs we do not detect, as well, presence of introns. But, in two of these seven pairs we detected by RT-PCR and Northern blot the presence of a “dicistronic” mRNA that covers the two ORFs. These long mRNAs were present in addition to the mRNA corresponding to the second ORF of the pair and, therefore, it seems they correspond to an aberrant termination of the transcription of the first gene that uses the downstream gene polyadenilation signal, rather than a functionally relevant dicistronic mRNA.

We conclude that in the yeast *S. cerevisiae* there is a minimum distance of 150 bp between ORFs because most of the supposed cases of shorter inter-ORF distance were false. For the exceptional cases in which there is a real short distance they seems to cause transcriptional problems like inefficient termination that could affect the regulation of the downstream gene.

### References:

- Dujon B. Trends Genet. (1996).12:263-270.
- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES. Nature. (2003). 423:241-254.
- Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M. Science. (2003). 301:71-76.