

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

**JORNADA DE
JÓVENES INVESTIGADORES
2018**



23 DE MAYO DE 2018

Salón de Actos del CIB

Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid



Organizada por:

Ernesto Arias

Valle Palomo

Dirección CIB



Jornadas de Jóvenes Investigadores 2018

23 de mayo de 2018

Salón de Actos

Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid

PROGRAMA

09:15–09:30 Inauguración de las Jornadas.

M^a Jesús Martínez. Directora del CIB.

09:30–11:10 Sesión 1. Moderador: Adrián Pérez Ramos

09:30–09:50 Finalista Premio al Mejor Trabajo 2017 (Departamento de Biología Estructural y Química)

Valle Palomo

Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. [J. Med. Chem., 2017, 60 (12), 4983–5001]

09:50–10:05 Charla Joven Investigador (Departamento de Biomedicina Molecular)

Julia Mayor

Evaluación del efecto del análogo alquilfosfolípido edelfosina, libre y en nanopartículas, sobre cáncer gástrico.

10:05–10:20 Charla Joven Investigador (Departamento de Biología Celular y Molecular)

Luis Martíns

Desarrollo de una vacuna recombinante frente a leishmaniasis canina.

10:20–10:40 Finalista Premio al Mejor Trabajo 2017 (Departamento de Biomedicina Molecular)

Virginia Albiñana

Repurposing propranolol as a drug for the treatment of retinal haemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. [Orphanet J. Rare Dis., 2017, 12(1), 122]

10:40–10:55 Charla Joven Investigador (Departamento de Biología Estructural y Química)

Juan Manuel González

La amoxicilina modifica proteínas intracelulares que pueden ser transportadas en exosomas a células diana.



10:55–11:10 Charla Joven Investigador (Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas)
Manuel Nieto *Xilanasas fúngicas para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica.*

11:10–11:30 Café.

11:30–13:15 Sesión 2. Moderadora: Josefa Zaldivar

11:30–11:50 Finalista Premio al Mejor Trabajo 2017 (Departamento de Biología Celular y Molecular)

Lorena Esteban *Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation.* [EMBO J., 2017, 36(12), 1688-1706]

11:50–12:05 Charla Joven Investigador (Departamento de Biología Estructural y Química)

Ioanna Kalograiaki *Estudio del reconocimiento de los ácidos teicóicos de Listeria por un dominio SH3b de endolisinas de fago mediante RMN.*

12:05–12:20 Charla Joven Investigador (Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas)

Felipe de Salas *Diseño de una lacasa fúngica como biocatalizador de la síntesis de un polímero electroconductor.*

12:20–12:40 Finalista Premio al Mejor Trabajo 2017 (Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas)

Cristian Carrasco *Environment dependent regulation of spliceosome activity by the LSM2-8 complex in Arabidopsis.* [Nucleic Acids Res., 2017, 45(12), 7416-7431]

12:40–12:55 Charla Joven Investigador (Departamento de Biomedicina Molecular)

Lucía Benito-Jardón *Mecanismos de resistencia a inhibidores de las MAP-quinasas en células de melanoma.*

12:55–13:10 Charla Joven Investigador (Departamento de Biología Celular y Molecular)

Arturo González *Control de la polarización transcripcional y funcional de macrófagos humanos por los receptores nucleares LXR.*

13:15–15:00 Descanso para la comida.



15:00–17:00 Sesión 3: “Salidas Alternativas a la Academia”

Moderadoras: Valle Palomo y Carmen Fernández

15:00–15:15 Lourdes Honorato, Jefa de Servicio de la Unidad de Investigación Científica y Técnica en la Comisaría General de Policía Científica de la Policía Nacional

15:15–15:30 Pilar Gallo, Directora de Comunicación del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC)

15:30–15:45 Isabela Alonso, Fundadora de *Managers4Science*

15:45–16:00 Miriam Redondo, *Medical Advisor* (PORIB, Pharmacoeconomics & Outcomes Research Iberia)

16:00–17:00 Mesa redonda:

Participantes: Lourdes Honorato, Pilar Gallo, Isabela Alonso, Miriam Redondo

17:00 Entrega de premios y clausura. Moderador: Ernesto Arias





I Edición
PREMIO AL MEJOR TRABAJO 2017

Patrocinado por Secugen



Trabajos que optan al premio:

Departamento de Biología Estructural y Química

Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases.

Valle Palomo, Daniel I. Perez, Carlos Roca, Cara Anderson, Natalia Rodríguez-Muela, Concepción Perez, Jose A. Morales-Garcia, Julio A. Reyes, Nuria E. Campillo, Ana M. Perez-Castillo, Lee L. Rubin, Lubov Timchenko, Carmen Gil, Ana Martínez.
J. Med. Chem. (2017) 60 (12), 4983–5001.

Departamento de Biomedicina Molecular

Repurposing propranolol as a drug for the treatment of retinal haemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease.

Virginia Albiñana, Rosa María Jiménez Escribano, Isabel Soler, Luis Rodríguez Padial, Lucía Recio-Poveda, Karina Villar Gómez de Las Heras, Luisa María Botella.
Orphanet J. Rare Dis. (2017) 12(1), 122

Departamento de Biología Celular y Molecular

Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation.

Lorena Esteban-Martínez, Elena Sierra-Filardi, Rebecca S. McGreal, María Salazar-Roa, Guillermo Mariño, Esther Seco, Sylvère Durand, David Enot, Osvaldo Graña, Marcos Malumbres, Ales Cvekl, Ana María Cuervo, Guido Kroemer, Patricia Boya.

EMBO Journal (2017) 36, 1688-1706

Departamento de Biotecnología Microbiana y de plantas

Environment-dependent regulation of spliceosome activity by the LSM2-8 complex in Arabidopsis.

Cristian Carrasco-López, Tamara Hernández-Verdeja, Carlos Perea-Resa, David Abia, Rafael Catalá, Julio Salinas.

Nucleic Acids Research (2017) 12, 7416–7431

El premio será otorgado por el siguiente jurado:

Dolores Pérez-Sala
Joaquín Teixidó
Ernesto Arias Palomo

ABSTRACTS FINALISTAS

Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases.

Valle Palomo^a, Daniel I. Perez^a, Carlos Roca^a, Cara Anderson^b, Natalia Rodríguez-Muela^c, Concepción Perez^d, Jose A. Morales-Garcia^{e,f}, Julio A. Reyes^d, Nuria E. Campillo^a, Ana M. Perez-Castillo^{e,f}, Lee L. Rubin^c, Lubov Timchenko^b, Carmen Gil^a, and Ana Martinez^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Pediatrics, Division of Neurology, Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, Ohio 45219, United States

^c Department of Stem Cell and Regenerative Biology and Harvard Stem Cell Institute, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, United States

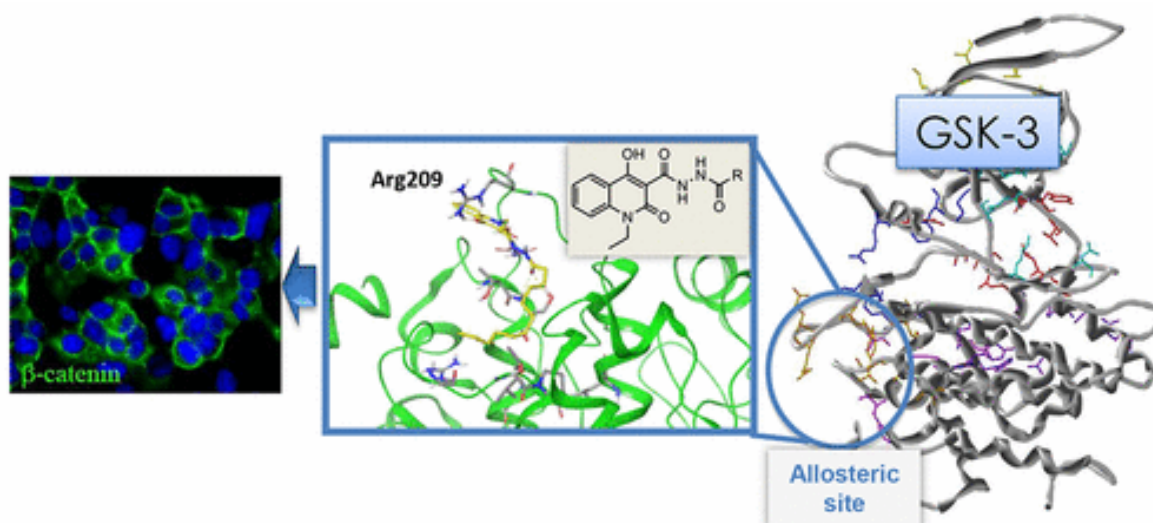
^d Instituto de Química Médica-CSIC, Juan del Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^e Instituto de Investigaciones Biomedicas-CSIC, Arturo Duperier 4, Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Calle de Valderrebollo 5, 28031 Madrid, Spain

e-mail: vpalomo@cib.csic.es

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) is a central target in several unmet diseases. To increase the specificity of GSK-3 β inhibitors in chronic treatments, we developed small molecules allowing subtle modulation of GSK-3 β activity. Design synthesis, structure–activity relationships, and binding mode of quinoline-3-carbohydrazide derivatives as allosteric modulators of GSK-3 β are presented here. Furthermore, we show how allosteric binders may overcome the β -catenin side effects associated with strong GSK-3 β inhibition. The therapeutic potential of some of these modulators has been tested in human samples from patients with congenital myotonic dystrophy type 1 (CDM1) and spinal muscular atrophy (SMA) patients. We found that compound 53 improves delayed myogenesis in CDM1 myoblasts, while compounds 1 and 53 have neuroprotective properties in SMA-derived cells. These findings suggest that the allosteric modulators of GSK-3 β may be used for future development of drugs for DM1, SMA, and other chronic diseases where GSK-3 β inhibition exhibits therapeutic effects.



Repurposing propranolol as a drug for the treatment of retinal haemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease.

Virginia Albiñana^{a,d}, Rosa María Jiménez Escribano^b, Isabel Soler^b, Luis Rodríguez Padial^b, Lucía Recio-Poveda^a, Karina Villar Gómez de las Heras^c and Luisa María Botella^{a,d}

^a Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Hospital Virgen de la Salud (SESCAM), Toledo, Spain

^c SSCC - Servicio de Salud de Castilla-La Mancha (SESCAM), Toledo, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

e-mail: vir_albi_di@yahoo.es

Von Hippel-Lindau (VHL) disease is a rare oncological disease with an incidence of 1:36,000, and is characterized by the growth of different types of tumours. Haemangioblastomas in the central nervous system (CNS) and retina, renal carcinoma and pheochromocytomas are the most common tumours. The absence of treatment for VHL leads to the need of repeated surgeries as the only option for these patients. Targeting VHL-derived tumours with drugs with reduced side effects is urgent to avoid repeated CNS surgeries. Recent reports have demonstrated that propranolol, a β -blocker used for the treatment of hypertension and other cardiac and neurological diseases, is the best option for infantile hemangioma (IH). Propranolol could be an efficient treatment to control haemangioblastoma growth in VHL disease given its antiangiogenic effects that were recently demonstrated by us. The main objective of the present study was the assessment of the efficacy and safety of propranolol on retinal haemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease (VHL).

Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation.

Lorena Esteban-Martínez^a, Elena Sierra-Filardi^a, Rebecca S McGreal^b, María Salazar-Roa^c, Guillermo Mariño^d, Esther Seco^a, Sylvère Durand^e, David Enot^e, Osvaldo Graña^f, Marcos Malumbres^c, Ales Cvekl^b, Ana María Cuervo^g, Guido Kroemer^{e,h}, Patricia Boya^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

^b Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

^c Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

^d Universidad de Oviedo Fundación para la Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (FINBA), Oviedo, Spain

^e Metabolomics and Molecular Cell Biology Platforms, Gustave Roussy, Villejuif, France

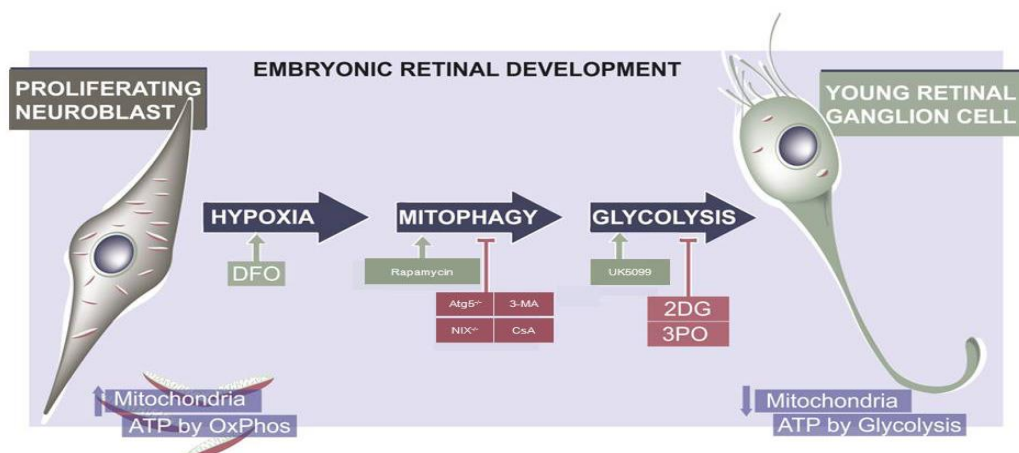
^f Bioinformatics Unit and Structural Biology and Biocomputing Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

^g Department of Developmental and Molecular Biology, Institute for Aging Studies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

^h Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. INSERM, U1138, Paris, France. Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Paris, France. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou AP-HP, Paris, France. Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

e-mail: lorena.esteban@cnic.es

Retinal ganglion cells (RGCs) are the sole projecting neurons of the retina and their axons form the optic nerve. Here, we show that embryogenesis-associated mouse RGC differentiation depends on mitophagy, the programmed autophagic clearance of mitochondria. The elimination of mitochondria during RGC differentiation was coupled to a metabolic shift with increased lactate production and elevated expression of glycolytic enzymes at the mRNA level. Pharmacological and genetic inhibition of either mitophagy or glycolysis consistently inhibited RGC differentiation. Local hypoxia triggered expression of the mitophagy regulator BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like (BNIP3L, best known as NIX) at peak RGC differentiation. Retinas from NIX-deficient mice displayed increased mitochondrial mass, reduced expression of glycolytic enzymes and decreased neuronal differentiation. Similarly, we provide evidence that NIX-dependent mitophagy contributes to mitochondrial elimination during macrophage polarization towards the proinflammatory and more glycolytic M1 phenotype, but not to M2 macrophage differentiation, which primarily relies on oxidative phosphorylation. In summary, developmentally controlled mitophagy promotes a metabolic switch towards glycolysis, which in turn contributes to cellular differentiation in several distinct developmental contexts.



Environment-dependent regulation of spliceosome activity by the LSM2-8 complex in Arabidopsis.

Cristian Carrasco-López^a, Tamara Hernández-Verdeja^a, Carlos Perea-Resa^a, David Abia, Rafael Catalá^a, Julio Salinas^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

^b Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Madrid, Spain

e-mail: prcarras@cib.csic.es

Spliceosome activity is tightly regulated to ensure adequate splicing in response to internal and external cues. It has been suggested that core components of the spliceosome, such as the snRNPs, would participate in the control of its activity. The experimental indications supporting this proposition, however, remain scarce, and the operating mechanisms poorly understood. Here, we present genetic and molecular evidence demonstrating that the LSM2–8 complex, the protein moiety of the U6 snRNP, regulates the spliceosome activity in Arabidopsis, and that this regulation is controlled by the environmental conditions. Our results show that the complex ensures the efficiency and accuracy of constitutive and alternative splicing of selected pre-mRNAs, depending on the conditions. Moreover, miss-splicing of most targeted pre-mRNAs leads to the generation of nonsense mediated decay signatures, indicating that the LSM2–8 complex also guarantees adequate levels of the corresponding functional transcripts. Interestingly, the selective role of the complex has relevant physiological implications since it is required for adequate plant adaptation to abiotic stresses.

These findings unveil an unanticipated function for the LSM2–8 complex that represents a new layer of posttranscriptional regulation in response to external stimuli in eukaryotes.

ABSTRACTS

Evaluación del efecto del análogo alquilfosfolípido edelfosina, libre y en nanopartículas, sobre cáncer gástrico

Julia Mayor Pillado, Consuelo Gajate y Faustino Mollinedo

Laboratorio de Muerte Celular y Terapia del Cáncer. Departamento de Biomedicina Molecular.

Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC.

e-mail: jumapi@cib.csic.es

Actualmente el **cáncer gástrico** es el cuarto tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Aunque su incidencia y mortalidad se han visto reducidas en los últimos años es necesario buscar nuevas aproximaciones terapéuticas que mejoren su mal pronóstico [1].

Los **análogos alquilfosfolípidos** son una familia de compuestos antitumorales que han demostrado inducir apoptosis selectiva en diversas células tumorales de distintos orígenes tisulares [2,3]. Nuestro objetivo es analizar el efecto de la edelfosina (figura 1), como representante de esta familia, sobre el cáncer gástrico.

Mediante estudios de citometría de flujo, análisis de proteínas y ensayos con inhibidores hemos determinado que la edelfosina además de inducir muerte celular por **apoptosis**, también lo hace por **necrosis** en distintos tipos de líneas celulares humanas de cáncer gástrico. La contribución de dichos tipos de muerte depende de la línea celular estudiada. Por otro lado, hemos encontrado que las células de cáncer gástrico poseen de forma constitutiva una importante activación de la **autofagia**, la cual se incrementa tras tratar las células con edelfosina. La autofagia actúa como una respuesta de supervivencia celular, ya que al inhibirla se aumenta la respuesta apoptótica tras el tratamiento con edelfosina.

En general las líneas celulares de cáncer gástrico se muestran muy resistentes a fármacos, por lo que se están estudiando las posibles causas. Por otra parte, estamos poniendo a punto el uso de **nanotecnología** para ver diferencias en la efectividad de la edelfosina sobre estas líneas celulares y posibles cambios en los mecanismos de acción. En concreto nos centraremos en la inclusión del compuesto de interés en nanopartículas lipídicas (SLN) y férricas (SPION).

Además, estamos poniendo a punto la generación de **gastric cancer stem cells** para estudiar el efecto de la edelfosina sobre ellas y su relación con la alta resistencia observada en las células de cáncer gástrico.

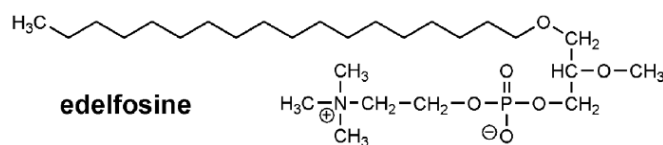


Figura 1: Estructura molecular de la edelfosina, representante prototipo de la familia de compuestos antitumorales análogos alquilfosfolípidos.

[1] Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. **2010**; 19:1893–907.

[2] Gajate, C.; Mollinedo, F. *Blood* **2007**, 109, 711-719.

[3] Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el-H, Fonteriz RI, Alvarez J, Mollinedo F, *Oncogene*. **2012** May 24; 31(21):2627-39.

Desarrollo de una vacuna recombinante frente a leishmaniasis canina

Luis Martins^a, Pedro J. Alcolea^a y Vicente Larraga^a

^aLaboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid,

e-mail: luistccm@cib.csic.es

Leishmaniasis es un grupo de enfermedades infecciosas que afectan varios mamíferos, causada por un parásito protozoario del género *Leishmania*, que posee un ciclo digénico y dimórfico, y transmitida por la picadura de un flebótomo hembra.^[1]

La mayoría de los tratamientos frente a esta enfermedad presentan varias desventajas. Por eso surge la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos o estrategias capaces de prevenir el desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo la vacunación o el desarrollo de nuevas dianas específicas para fármacos.^[2]

Nosotros seleccionamos un gen específico que codifica una proteína enoyl-CoA (ECH) de *L. infantum* (LinJ.29.2420), que se encuentra sobre-expresado en el estadio más infectivo de este parásito, el promastigote metacíclico, aislados por selección negativa con aglutinina de cacahuete.^[3] Este perfil de expresión puede estar directamente relacionado con la infectividad del parásito.

La ECH tiene ambas actividades de hidratasa y isomerasa, que están involucradas en la ruta de la β -oxidación lipídica.^[4]

Este gen fue clonado, con la utilización de las enzimas de restricción BamH I y Hind III, en el plásmido de expresión pQE30 de células de *E. coli*. Las condiciones óptimas de expresión de la proteína codificada por este gen fueron 2h a 37°C. Para obtener parásitos de *L. infantum* knock-in este gen fue también clonado en el plásmido pIRmcs3 utilizando las enzimas Bgl II y Ned I. Un anticuerpo policlonal fue obtenido tras la infección de tres conejos Nueva Zelanda, con 600µg de proteína purificada.

La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad con columnas de Ni²⁺. La abundancia de la proteína ECH fue medida a lo largo del ciclo biológico de *L. infantum* wild-type y estirpes knock-in.

Gracias a programas como I-Tasser, PyMOL y BlastP juntos con la base de datos de PDB fue posible predecir un modelo 3D de la proteína. Con el software ClustalW fue posible analizar la homología proteica y genética.

Se llevaron a cabo también estudios de infectividad *in vitro* con macrófagos previamente diferenciados de células U937.

El gen que codifica para la enoyl-CoA sobre-expresado en la fase más infectiva de promastigotas de *L. infantum* fue clonado y la proteína recombinante correspondiente fue purificada en condiciones nativas y desnaturalizadas. La abundancia de proteína, la utilización de parásitos knock-in, ya que no se pueden llevar a cabo estudios knock-out por ser un gen constitutivo, así como los estudios de infectividad y protección nos van ayudar a relacionar esta proteína con la infectividad del parásito. Los porcentajes de homología y la estructura predicha de la proteína sugieren que esta puede ser una buena diana terapéutica.

[1] Cantacessi C., Dantas-Torres F., Nolan M. J., Otranto D., Trends in Parasitology, 2015, vol. 31, 100-108

[2] Lemesre J. L., Holzmüller P., Gonçalves R. B., Bourdoiseau G., Hugnet C., Cavaleyra M., Papierok G., Vaccine, 2007, vol. 25, 4223-4234

[3] Pedro J. Alcolea, Ana Alonso, Alicia Sánchez-Gorostiaga, Mercedes Moreno-Paz, Manuel J. Gómez, Irene Ramos, Víctor Parro, Vicente Larraga, Genomics, 2009, vol. 93, 551-564

[4] Engel C. K., Kiema T. R., Hiltunen J. K., Wierenga R. K., Journal of Molecular Biology, 1998, vol. 93, 847-859

La amoxicilina modifica proteínas intracelulares que pueden ser transportadas en exosomas a células diana

Francisco J. Sánchez-Gómez^a, Juan M. González-Morena^a, Yolanda Vida^{b,c}, Ezequiel Pérez-Inestrosa^{b,c}, Miguel Blanca^d, María J. Torres^d, Dolores Pérez-Sala^a

^a*Departamento de Biología Estructural y Química, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España*

^b*Departamento de Química Orgánica, Universidad de Málaga, IBIMA, Málaga, España*

^c*Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología-BIONAND, Málaga, España*

^d*Unidad de Alergia, IBIMA-Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, España*

e-mail: juanm.gonzalezm@gmail.com

Los antibióticos betalactámicos, especialmente la amoxicilina, son uno de los grupos de fármacos que más reacciones alérgicas producen, constituyendo un problema clínico importante. El mecanismo por el cual estos fármacos desencadenan la reacción alérgica no se conoce con precisión. Se considera que los antibióticos betalactámicos son moléculas demasiado pequeñas para ser reconocidas directamente por el sistema inmune, por lo que actuarían como haptenos, es decir, se unirían covalentemente a macromoléculas, como proteínas propias del paciente, para poder iniciar la respuesta alérgica. La modificación covalente de proteínas por fármacos se denomina haptización. Las proteínas haptizadas serían degradadas intracelularmente para formar los antígenos, que serían expuestos en la superficie de las células presentadoras de antígenos. En este trabajo se han identificado y confirmado nuevas dianas de haptización por amoxicilina, como HSP70, el factor de elongación 2 y la α -enolasa, empleando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Además, se ha establecido que las proteínas haptizadas pueden ser secretadas al medio extracelular, ya sea en forma soluble o asociadas a exosomas. Las proteínas haptizadas asociadas a estas microvesículas pueden ser captadas e internalizadas por otros tipos celulares. Los resultados de este trabajo establecen por primera vez la identificación de proteínas intracelulares haptizadas por amoxicilina y el posible papel de los exosomas como mediadores de la respuesta alérgica frente a este fármaco. Este estudio ayudará a comprender mejor el proceso de haptización por antibióticos betalactámicos y el papel de las proteínas haptizadas en la respuesta alérgica.

Xilanasas fúngicas para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica

Manuel Nieto Domínguez^a, Laura I. de Eugenio^a, Alicia Prieto^a y María Jesús Martínez^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas CIB-CSIC, Madrid, España

e-mail: manunieto@cib.csic.es

El xilano constituye la segunda mayor reserva de carbono de la biosfera, sólo precedido por la celulosa. Es la hemicelulosa más abundante y estructuralmente se compone de una cadena principal de unidades de D-xilopiranosas unidas por enlaces β -1,4. Este esqueleto suele presentar un alto grado de sustituciones que, aunque varían según la fuente vegetal, principalmente residuos de α -L-arabinofuranosa o ácido glucurónico. Debido a esta complejidad su hidrólisis necesita de la acción concertada de toda una batería de enzimas, de entre las cuales las endoxilanasas y las β -xilosidasas desempeñan los papeles esenciales. Las primeras hidrolizan el polisacárido atacando enlaces internos de la cadena principal, liberando como productos oligosacáridos con distinto grado de polimerización. Las β -xilosidasas son enzimas que completan la degradación, convirtiendo estos xilooligosacáridos (XOS) en xilosa.

Las enzimas xilanolíticas son producidas en la naturaleza principalmente por bacterias y hongos para degradar los polisacáridos de la pared celular vegetal. Entre estos organismos los hongos filamentosos han adquirido una especial relevancia por secretar muchas de estas enzimas, con altos niveles de actividad. En este trabajo se ha utilizado como fuente de biocatalizadores el ascomiceto *Talaromyces amestolkiae*, aislado de residuos de cereal e identificado en el Grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica. De este organismo se han purificado una endoxilanasas y una β -xilosidasas de las familias GH11 y GH3 respectivamente. Ambas enzimas han sido caracterizadas, expresadas con alto rendimiento en la levadura *Pichia pastoris* y aplicadas exitosamente a distintos procesos de interés biotecnológico.

La endoxilanasas se ha utilizado para hidrolizar xilano de abedul obteniendo XOS con efecto prebiótico demostrado utilizando microfermentaciones de heces de bebés lactantes^[1]. La β -xilosidasas, se ha utilizado para sintetizar glicósidos de interés farmacológico ya que puede transferir un residuo de xilosa, a partir de xilobiosa, a un gran número de aceptores de importancia biotecnológica. Mediante este mecanismo se ha catalizado la síntesis de un xilósido de hidroxitirosol (el principal antioxidante del aceite de oliva), mostrando este compuesto una importante mejora en sus propiedades de neuroprotección^[2]. Con este mismo biocatalizador se ha logrado la síntesis enzimática del 2-(6-hidroxinaftil) β -D-xilopiranosido^[3], un nuevo agente antiproliferativo selectivo que hasta la fecha solo se había obtenido por procedimientos químicos. Finalmente, dado que el donador utilizado en estas reacciones es costoso (xilobiosa), se ha utilizado una cascada enzimática, combinando la endoxilanasas y β -xilosidasas de *T. amestolkiae*, para obtener estos xilósidos bioactivos partiendo directamente del xilano, un polisacárido presente en muchos residuos vegetales.

Actualmente, se están caracterizando algunas hemicelulasas auxiliares (α -L-arabinofuranosidasas y glucuronidasas) que se añadirán a estas cascadas enzimáticas a fin de aprovechar eficientemente xilanos de estructuras más complejas. Al mismo tiempo se han obtenido mutantes de la β -xilosidasas con propiedades catalíticas mejoradas para llevar a cabo las reacciones de síntesis de interés.

[1] M. Nieto-Domínguez, L.I. de Eugenio, M.J. York-Durán, B. Rodríguez-Colinas, F.J. Plou, E. Chenoll, E. Pardo, F. Codoñer, M.J. Martínez, *Food Chem.*, **2017**, 232, 105-113.

[2] M. Nieto-Domínguez, L.I. de Eugenio, P. Peñalver P, E. Belmonte-Reche, J.C. Morales, A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A. Prieto, F.J. Plou, M.J. Martínez, *J Agric Food Chem.*, **2017**, 65, 10526-10533.

[3] M. Nieto-Domínguez, A. Prieto, B. Fernández de Toro, F.J. Cañada, J. Barriuso, Z. Armstrong, S.G. Withers, L.I. de Eugenio, M.J. Martínez, *Microb Cell Fact.*, **2016**, 15, 1-15.

Estudio del reconocimiento de los ácidos teicóicos de *Listeria* por un dominio SH3b de endolisinas de fago mediante RMN

Ioanna Kalograiaki^a, Yang Shen^b, Alessio Prunotto^c, Matteo Dal Peraro^c, Martin J. Loessner^b and F. Javier Cañada^a

^a Departamento de Biología Estructural y Química, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle de Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España

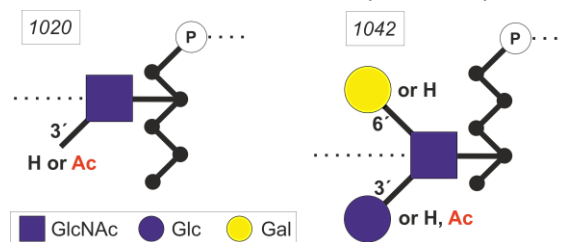
^b Laboratory of Food Microbiology, Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, Schmelzbergstrasse 7, CH-8092 Zurich, Suiza

^c Laboratory for Biomolecular Modeling, École Polytechnique Federale de Lausanne, AAB-015, 1015 Lausanne, Suiza

e-mail: ikalograiaki@cib.csic.es

Los ácidos teicóicos (WTA, *w*all *t*eichoic *a*cids) son los glicopolímeros más diversos y abundantes en la pared de bacterias Gram-positivas, por ejemplo de *Listeria monocytogenes* cuyo patrón antigénico se correlaciona con su virulencia^[1]. Frecuentemente la estructura de los WTA define el reconocimiento por endolisinas de bacteriófagos, enzimas que son capaces de provocar lisis bacteriana mediante su dominio catalítico. Sin embargo, la susceptibilidad a esta acción depende de la selectividad del dominio de unión a la pared celular que habitualmente es un dominio de unión a carbohidratos (CBD, *c*arbohydra*t*e-*b*inding *d*omain). A pesar de los recientes avances en el análisis de glicanos, la elucidación de la relación estructura-función de los WTA de *L. monocytogenes* sigue siendo un reto debido a su gran heterogeneidad en términos de longitud del polímero, de conectividad entre GlcNAc y ribitol (Rbo) y de modificaciones puntuales como la O-acetilación o glicosilación adicional de la unidad de GlcNAc^[2].

Observaciones preliminares por Resonancia de Plasmon de Superficie habían indicado la relevancia de la O-acetilación y/o glicosilación de los WTA de *Listeria* para su reconocimiento por CBD500, un dominio CBD que presenta homología con el Src 3 bacteriano (SH3b). Experimentos de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD-NMR) de CBD500 con un panel de WTA nativos y mutantes que seguían distintos patrones antigénicos (1020 y 1042) han demostrado que la disparidad en la conectividad de GlcNAc a Rbo y las sustituciones variables sobre GlcNAc determinan la especificidad de la unión. Adicionalmente, el análisis por CORCEMA (*c*omplete *r*elaxation and *c*onformational *e*xchange *m*atrix) ha permitido la selección de las poses más compatibles con los datos experimentales de STD-NMR, obtenidas mediante docking y simulaciones de dinámica molecular. La definición del epítipo y los estudios de docking han apoyado lo obtenido mediante mutagénesis dirigida, sugiriendo el establecimiento de un único sitio de unión comprendido por los residuos Phe175, Trp 198, Asn248 y Ser249. Se trata del primer estudio que aporta información estructural para la interacción entre un dominio tipo SH3b y ácidos teicóicos nativos, y aspira a guiar futuros estudios sobre la relación estructura-función de estos glicopolímeros, apoyando a la vez el potencial uso de dominios de endolisinas en el diseño de novedosos constructos antimicrobianos.



Este trabajo se ha financiado parcialmente por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CTQ2015-64597-C2-2-P)

[1] J.A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 14, 584–640.

[2] Y. Shen, S. Boulos, E. Sumrall, B. Gerber, A. Julian-Rodero, M.R. Eugster, L. Fieseler, L. Nyström, M.-O. Ebertl and M.J. Loessner, *Journal of Biological Chemistry* **2017**, 292, 17832-17844.

Diseño de una lacasa fúngica como biocatalizador de la síntesis de un polímero electroconductor

Felipe de Salas^a, Susana Camarero^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

e-mail:fsalas@cib.csic.es

La evolución dirigida y el diseño asistido por computación son poderosas herramientas para el diseño de enzimas. Para la evolución en el laboratorio de una proteína, el gen completo o regiones concretas se someten a mutagénesis al azar y/o recombinación y las librerías de mutantes se expresan en un hospedador de interés, en nuestro caso *Saccharomyces cerevisiae*, y se someten a un proceso de cribado en las condiciones en las que queremos mejorar la enzima^[1]. En el laboratorio de la Dra Susana Camarero estamos especializados en la evolución dirigida de enzimas oxidasas (lacasas). Las lacasas son oxidasas multicobre secretadas por una gran variedad de organismos (desde bacterias a algunos insectos) siendo los hongos de podredumbre blanca de la madera los más importantes productores de estas enzimas. Las lacasas oxidan un amplio rango de sustratos (aminas aromáticas, fenoles y otros compuestos aromáticos), y solo requieren oxígeno del aire, produciendo H₂O como único subproducto. Por todo ello, estas enzimas son biocatalizadores de elección para variedad de reacciones de interés industrial. Una de ellas es la síntesis de polianilina.

La polianilina (PANI) es un polímero lineal de anilina capaz de conducir la electricidad en función de su estado de oxido-reducción y de protonación. La polianilina tiene una gran cantidad de aplicaciones como biosensores, supercondensadores, aislantes o como parte de paneles fotovoltaicos. Actualmente su síntesis industrial se basa en procesos químicos que dan lugar a una polianilina insoluble en agua, produciéndose durante la síntesis una gran cantidad de residuos tóxicos. La capacidad de la lacasa de catalizar la síntesis de un polímero altamente conductor y soluble en agua, sumada a la posibilidad de obtener diferentes nanoestructuras dependiendo de las condiciones de síntesis utilizadas, hacen de la síntesis enzimática un proceso de gran interés industrial.^[3]

Para obtener una lacasa óptima para la síntesis de polianilina se comenzó por seleccionar entre las variantes previamente obtenidas en el laboratorio, una lacasa con capacidad de oxidar aminas aromáticas y estable en las condiciones de polimerización de anilina.^[2] Además se puso a punto un método de cribado en "high-throughput" usando una amina aromática análoga a la anilina (con una menor toxicidad). Se realizaron varios ciclos de evolución sobre la enzima seleccionada siguiendo diferentes aproximaciones mutagénicas. También se añadieron nuevas mutaciones que incrementaban la actividad frente aminas aromáticas mediante mutagénesis dirigida de residuos previamente seleccionados mediante diseño computacional.^[4] Finalmente se intercambió el C-terminal de la enzima por el de otra variante más estable de nuestra colección, con el fin de incrementar la termoestabilidad de la enzima (que se había visto disminuida durante el proceso evolutivo). La enzima evolucionada presenta 9 nuevas mutaciones respecto a la parental y tiene una velocidad de oxidación de anilina más de 10 veces superior que la lacasa de partida.

[1] Susana Camarero, Isabel Pardo *et al*, Applied and Environmental Microbiology, **2012**, 78, 1370-1384.

[2] Isabel Pardo, Ana Isabel Vicente *et al*, Biotechnology and Bioengineering, **2012**, 109, 2979-2986.

[3] Felipe de Salas, Isabel Pardo *et al*, Plos One, **2016**, 1-18.

[4] Gerard Santiago, Felipe de Salas *et al*, ACS Catalisys, **2016**, 6, 5415-5423.

Mecanismos de resistencia a inhibidores de las MAP-quinasas en células de melanoma

Lucía Benito-Jardón, Marta Díaz-Martínez, Paloma Vaquero-Morales y Joaquin Teixidó

Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

e-mail: luciabj@cib.csic.es

El tratamiento del melanoma con los inhibidores de BRAF V600E (BRAFi) vemurafenib (VMF) o dabrafenib, tiene efectos terapéuticos beneficiosos para los pacientes^[1,2]. Sin embargo, la eficacia del tratamiento se ve limitada por la adquisición de resistencia y la reaparición de los tumores. Aunque el tratamiento combinado con inhibidores de BRAF e inhibidores de MEK como el trametinib (TMT) incrementa la supervivencia de los pacientes^[3], la aparición de resistencias continúa siendo un problema. Se han descrito múltiples mecanismos de resistencia a monoterapia y a terapias combinadas en melanoma, la mayoría de los cuales conllevan la reactivación de la vía MAPK (RAF/MEK/ERK)^[4,5]. Por ello, una estrategia que actualmente se está estudiando es la inhibición directa de ERK, tanto en melanoma como en otros tipos de cáncer^[6,7].

Para anticipar las posibles respuestas de resistencia a inhibidores de ERK, hemos generado diferentes líneas de melanoma con resistencia a SCH772984 (SCH), un inhibidor de ERK. Las células resistentes a SCH (*ERK inhibitor resistant*, ER) presentan asimismo resistencia a VMF, TMT y a las combinaciones de VMF y TMT o VMF y SCH. Las células de melanoma A375-ER y SK-Mel28-ER muestran una reducción significativa de los niveles de fosfo-ERK1/2, acompañada de un incremento de la activación de ERK5 y de un aumento de la expresión de c-myc, diana de ERK5. Además, la disminución de la activación de ERK1/2 y el incremento de ERK5 se observa también en células de melanoma con resistencia doble a VMF y TMT, y a VMF y SCH. La inhibición de la vía MEK5-ERK5 con inhibidores de MEK5, la expresión de una forma dominante negativa de MEK5 o el silenciamiento de ERK5, demuestran la implicación de esta vía en la resistencia a SCH. Por otra parte, las células resistentes a SCH presentan un incremento en la expresión y la activación de IGF-1R. Notablemente, la inhibición de este receptor da lugar a una disminución de la activación de ERK5 y contrarresta la resistencia a SCH. Estos resultados indican que las células de melanoma pueden superar el bloqueo de la activación de ERK1/2 mediante la estimulación de la vía IGF-1R/MEK5/ERK5.

[1] Gideon Bollag, Peter Hirth et al., *Nature*, **2010**, 467,596-9

[2] Paul B. Chapman, Axel Hauschild et al., *N Engl J Med*, **2011**, 364, 2507-16

[3] Keith T. Flaherty, Jeffery R. Infante et al., *N Engl J Med*, **2012**, 367, 1694-703

[4] Mateo S. Carlino, Georgina V. Long et al., *Crit Rev Oncol Hematol*, **2015**, 96, 385-98

[5] Su Yin Lim, Alexander M. Menzies et al., *Cancer*, **2017**, 123, 2118-2129

[6] Erick J. Morris, Sharda Jha et al., *Cancer Discov*, **2013**, 3, 742-50

[7] Deborah J.L. Wong, Lidia Robert, et al., *Molecular Cancer*, **2014**, 13, 194

Control de la polarización transcripcional y funcional de macrófagos humanos por los receptores nucleares LXR

Arturo González de la Aleja^a, Antonio Castrillo^b y Ángel Corbí^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC)

^bInstituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid (IBBM CSIC-UAM)

e-mail: agonzaleza@cib.csic.es

Los macrófagos son una población heterogénea de células mieloides que regulan el correcto funcionamiento del organismo y presentan una elevada heterogeneidad, fenotípica y funcional^[1–3]. El balance apropiado entre macrófagos proinflamatorios y antiinflamatorios es crucial para la resolución de la inflamación, y su desregulación promueve o colabora en múltiples patologías^[4–6]. Por ello, el conocimiento de los factores que regulan la plasticidad funcional de los macrófagos es de vital importancia. Entre las múltiples moléculas que controlan la versatilidad funcional de los macrófagos destaca la subfamilia de los receptores nucleares LXR. Ambas isoformas, la isoforma alfa (LXR α , NR1H3) y la isoforma beta (LXR β , NR1H2), se expresan en todos los tejidos pero la isoforma α predomina especialmente en macrófagos humanos^[7,8] donde además presenta varias isoformas de *splicing* (subisoformas)^[9,10]. Los receptores nucleares LXR son importantes reguladores del metabolismo del colesterol y otros lípidos^[11,12], si bien cumplen funciones adicionales en el terreno de las respuestas inflamatorias y la autoinmunidad^[13,14].

Partiendo de estos hechos, nuestro objetivo es determinar la función de los receptores LXR en la polarización de macrófagos humanos, analizando las funciones específicas de LXR α y LXR β , y a su vez de las subisoformas de LXR α , en la plasticidad funcional de macrófagos humanos. Para ello, emplearemos macrófagos humanos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos: macrófagos generados en presencia de GM-CSF (macrófagos GM-M Φ), que adquieren funciones proinflamatorias, y macrófagos generados en presencia de M-CSF (M-M Φ), que exhiben una potente actividad trófica, reparadora y antiinflamatoria^[15,16]

Las tareas que se están llevando a cabo en la actualidad incluyen: 1) la caracterización de la expresión proteica de estos receptores mediante western blot y en diferentes condiciones de cultivo; 2) el análisis de la expresión de las diferentes subisoformas de LXR α en ambos tipos de macrófagos, como paso previo a la evaluación de sus funciones biológicas; y 3) el análisis preliminar del efecto que la activación o inactivación de los receptores LXR tiene sobre la diferenciación de macrófagos mediante el empleo de agonistas y antagonistas sintéticos de ambos receptores.

Una vez finalizados estos experimentos, los experimentos futuros irán destinados a identificar los factores que controlan la expresión de los receptores LXR, y sus isoformas, en macrófagos a nivel de mRNA y proteína, y a profundizar en el estudio de su implicación en la polarización funcional de macrófagos humanos.

Referencias

- [1] E. G. Perdiguero & F. Geissmann. *Nature immunology*, **2015**, 17, 2–8
- [2] R. Chovatiya & R. Medzhitov. *Molecular Cell*, **2014**, 54, 281–288
- [3] T. a Wynn *et al.* *Nature*, **2013**, 496, 445–55
- [4] E. C. Steinbach & S. E. Plevy. *Inflammatory Bowel Diseases*, **2014**, 20, 166–175
- [5] I. A. Udalova *et al.* *Nature Reviews Rheumatology*, **2016**, 12, 472–485
- [6] F. L. Heppner *et al.* *Nature Reviews Neuroscience*, **2015**, 16, 358–372
- [7] R. Apfel *et al.* *Molecular and cellular biology*, **1994**, 14, 7025–35
- [8] P. J. Willy *et al.* *Genes and Development*, **1995**, 9, 1033–1045
- [9] K. Endo-Umeda *et al.* *Molecular Pharmacology*, **2012**, 81, 800–810
- [10] M. Chen *et al.* *Journal of Lipid Research*, **2005**, 46, 2570–2579
- [11] C. Zhao & K. Dahlman-Wright. *Journal of Endocrinology*, **2010**, 204, 233–240
- [12] C. Hong & P. Tontonoz. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2014**, 13, 433–444
- [13] N. A-Gonzalez *et al.* *Immunity*, **2009**, 31, 245–258
- [14] A. Castrillo *et al.* *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 10443–10449
- [15] D. C. Lacey *et al.* *The Journal of Immunology*, **2012**, 188, 5752–5765
- [16] J. A. Hamilton. *Nature Reviews Immunology*, **2008**, 8, 533–544

----- NOTAS -----

----- NOTAS -----