

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA REGENERATIVA (CABIMER)

Composición

	Hombres	Mujeres	Total
Investigadores/as Principales	18	1	19
Personal Investigador	16	42	58
Técnicos/as de Laboratorio	8	15	23
Personal Investigador en Formación	26	34	60
Técnico/a de Unidades de Apoyo	3	22	25
Personal de Administración	5	9	14
Total: 199	76	123	199

	CSIC	FPS	UPO	US
Investigadores/as Principales	8	3	2	6
Personal Investigador	20	17	3	14
Técnicos/as de Laboratorio	3	13	2	3
Personal Investigador en Formación	18	10	6	6
Técnico/a de Unidades de Apoyo	2	21	1	0
Personal de Administración	0	12	0	2
Total:172 **	51	76	14	31

** 27 personas adscritas a otras entidades

Áreas de Investigación

La actividad investigadora del Centro se desarrolla en cuatro grandes Departamentos:

- Biología Molecular
- Señalización Celular
- Células Troncales
- Terapia Celular y Medicina Regenerativa

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El Departamento de Biología Molecular tiene como objetivo identificar y entender los genes y mecanismos que controlan la estabilidad y expresión de los genomas eucarióticos. Está abierto al estudio de células humanas y organismos modelos que permitan un abordaje complementario y más sofisticado como son las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* o el gusano *C. elegans*, y de modelos animales murinos. El objetivo último es entender el impacto que la estabilidad del genoma y su expresión tienen en los procesos de proliferación y división celular y en diferenciación celular. Estos objetivos están enmarcados dentro del interés general del Centro sobre problemas actuales de la Biomedicina, que incluyen preferentemente el origen del cáncer, síndromes genéticos relacionados con la estabilidad de los genomas y la estabilidad genética de células en diferenciación y desarrollo.

El Departamento tiene una proyección metodológica concreta dentro del Centro al hacer aproximaciones genéticas y bioquímicas a los problemas estudiados, además de la Biología Celular, y tiene el propósito de usar y poner a punto abordajes de alto rendimiento de genómica funcional y proteómica.

La estructura es la siguiente:

Chairman: Andrés Aguilera (Profesor de Genética, Univ. Sevilla).

MB1: PI: Andrés Aguilera (Profesor).

Nombre: Inestabilidad genómica y mRNP biogénesis.

Personal: 22 investigadores, 1 profesor visitante y 1 secretaria de dirección.

MB2: PI: José Carlos Reyes (Investigador Principal, CSIC).

Name: Epigenética.

Personal: 7 investigadores.

MB3: PI: Félix Prado (Investigador Principal, CSIC).

Name: Cromatina y reparación de DNA.

Personal: 4 investigadores.

MB4: PI: Ralf Wellinger (Profesor-contratado, Univ. Sevilla).
Name: Mitochondrial plasticity and replication.
Personal: 4 investigadores.

MB5: PI: Fernando Monje-Casas ('Ramón y Cajal' Investigador, Univ. Sevilla).
Nombre: Chromosomal segregation.
Personal: 1 investigador.

Líneas de Investigación

La división y proliferación celular son procesos básicos en diferenciación y desarrollo. Están ligados y están sujetos a un estricto control genético y a mecanismos que garantizan la integridad y correcta segregación de los genomas. Las líneas de investigación prioritarias de este Departamento tratan de conocer los factores y mecanismos que gobiernan estos procesos.

En las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto que la activación, la represión y el silenciamiento de la transcripción conllevan cambios en la estructura de la cromatina de promotores y regiones reguladoras. Además, la herencia de estados de transcripción diferentes, esencial durante la diferenciación celular, también implica modificaciones de la cromatina (marcas epigenéticas). Igualmente, existen evidencias crecientes que implican una correcta estructura y ensamblaje de la cromatina en el mantenimiento de la integridad de los genomas. Las razones de esta asociación no están claras aún, pero se conocen al menos dos vías por las que la integridad de los genomas puede verse comprometida. Por un lado, defectos en el ensamblaje de nueva cromatina durante la replicación del DNA, puede llevar consigo la acumulación de daños replicativos recombinogénicos. Por otro, un cambio en el patrón de expresión de genes con un papel directo en el mantenimiento de la integridad, como pueden ser genes de replicación o reparación entre otros.

Estos antecedentes indican que la estructura del cromosoma es un factor determinante en la función y dinámica de los genomas. No obstante, no es el único factor ni el más importante. Así, procesos biológicos como la replicación, la transcripción, el transporte del RNA del núcleo al citoplasma, la reparación del DNA o la replicación pueden afectar la integridad de los genomas y su segregación. La, en

principio, sorprendente interconexión entre procesos aparentemente independientes del núcleo celular revelan la importancia de entender los mecanismos y factores que controlan la función de los genes así como la estabilidad de los genomas para entender y controlar la proliferación y diferenciación celular, dos aspectos básicos de la Investigación Biomédica.

Los objetivos generales enmarcados en la investigación a desarrollar en este Departamento se centran en descifrar los factores y mecanismos implicados en la dinámica y función de los genes y cromosomas eucarióticos, su papel en proliferación y diferenciación celular y su impacto en la estabilidad de los genomas así como en envejecimiento y muerte celular. En último término, se pretende aportar conocimiento útil para potenciar la prevención del cáncer, mejorar la terapia contra el cáncer, y garantizar el control de la diferenciación bajo un programa genético definido y estable.

Las líneas de investigación de este Departamento se resumen en:

- Checkpoints de replicación y reparación de roturas cromosómicas. Señalización de daños cromosómicos.
- Inestabilidad genética asociada a transcripción. Función de los complejos protéicos THO-TREX, Thp1-Sac3, Mex67-Mtr2 y otros relacionados en el acoplamiento transcripción-transporte y su impacto en integridad genómica.
- Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción. Papel de los complejos NOT y PAF.
- Métodos para aumentar o disminuir los daños en el DNA generados mediante tratamientos quimioterapéuticos. Conexión entre inestabilidad genética y carcinogenidad.
- Función de las proteínas SMC (cohesinas, condensinas y SMC5,6) en la integridad y segregación de los genomas.
- Control de la replicación del DNA y su impacto en el origen de la inestabilidad genética.
- Proteómica del envejecimiento celular.
- Epigenética de la reparación de roturas de doble cadena del DNA. Inestabilidad genética asociada a defectos de ensamblaje de cromatina.
- Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP que intervienen en transcripción.

- Silenciamiento transcripcional mediado por RNA de interferencia. Caracterización de la helicasa de RNA TDRD9 en el silenciamiento transcripcional mediado por RNA de interferencia.
- Mecanismos y funciones del proceso de modificación por SUMO de proteínas de la familia BET y las histonas.
- Identificación de genes eucarióticos implicados en estabilidad genómica mediante análisis de alto rendimiento con genotecas de depleción generados por RNAi en humanos o de knock-outs en *S. cerevisiae*.
- Papel de las ATPasas CHD6 a CHD9 en remodelación de la cromatina asociada a la elongación de la transcripción.
- Regulación del tránsito núcleo citoplásmico de la proteína supresora de tumores SNF5, una subunidad del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF.
- Acoplamiento entre transcripción y transporte del RNA: factores y mecanismos.
- Papel de CtIP en reparación de cortes de doble cadena y su papel en la génesis de enfermedades humanas.
- Regulación de la resección de cortes de doble cadena y su papel en el desarrollo del cáncer.
- Control de la recombinación homóloga por el ciclo celular.

Las diferentes líneas de investigación abordan problemas básicos celulares mediados por factores y mecanismos conservados en todos los eucariotas y se llevan a cabo de forma complementaria en células humanas, murinas y de *Saccharomyces cerevisiae*.

DEPARTAMENTO DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La constatación de que alteraciones en la transducción de señales en la célula son la base de numerosas patologías neoplásicas, autoinmunes y degenerativas ha conducido a un gran esfuerzo para conocer los mecanismos e identificar las proteínas que controlan el comportamiento celular tanto a nivel individual como en el contexto del tejido y órgano del que forman parte.

En la actualidad, los centros de investigación más importantes a nivel internacional incluyen en su organización unidades o departamentos dedicados al estudio de los mecanismos de señalización celular y de la transmisión de señales bioquímicas desde el exterior celular al núcleo. Por lo anteriormente expuesto, la existencia en un centro de Biomedicina como CABIMER de un departamento donde tengan cabida grupos dedicados al estudio de diversos aspectos relacionados con los mecanismos moleculares y celulares de la señalización celular no sólo es deseable sino también necesario.

Está constituido por los siguientes grupos:

Chairman: Rosa M. Ríos

- Grupo 1: Señalización en la Muerte Celular: Abelardo López Rivas (IP, Profesor de Investigación CSIC).
- Grupo 2: Ciclo Celular y Oncogénesis: José Antonio Pintor Toro (IP, Investigador Científico CSIC).
- Grupo 3: Mecanismos de Organización Intracelular: Rosa M.^a Ríos (IP, Científico Titular del CSIC).
- Grupo 4: Factores Neurotróficos y Enfermedades Neurodegenerativas: Alfredo Rodríguez Tebar (IP, Investigador Científico CSIC).
- Grupo 5: Terapias Avanzadas en Neuroprotección (IP, científico titular David Pozo).

Líneas de Investigación

En los últimos años se ha desarrollado en torno a la señalización celular un área de investigación única en Biología y Medicina que va desde el análisis detallado de las moléculas y los mecanismos señalizadores hasta el estudio de sus efectos fenotípicos y patológicos. La importancia del estudio de los mecanismos de señalización reside en que casi todas las funciones celulares, división, muerte o degeneración de las células, establecimiento de la polaridad o de las adhesiones celulares, migración o diferenciación celulares, son el resultado de señalizaciones específicas y su desregulación causa patologías severas.

Los distintos grupos del Departamento de Señalización Celular tienen como objetivos el estudio de varias de estas funciones celulares desde sus aspectos más básicos y la elaboración de estrategias que permitan una mayor eficacia en el tratamiento de ciertas enfermedades.

- **Mecanismos de Organización Intracelular**

Desde el punto de vista básico, comprender cómo sucesos tan simples como las modificaciones post-traduccionales o las interacciones proteína-proteína pueden producir respuestas biológicas adecuadas en el denso ambiente de la célula es un reto importante. Los últimos datos apuntan a células donde se localizan el aparato de Golgi y el centrosoma se ha revelado como la estación principal de señalización. Ambos orgánulos comparten una estrecha relación funcional que se mantiene en multitud de procesos celulares como el establecimiento de la polaridad y la migración mientras que desaparece en otros como la mitosis o la apoptosis. Se han descrito más de 100 patologías cuyo origen es un fallo en la organización y funcionamiento de estos orgánulos. Nuestro interés se centra en desvelar los mecanismos moleculares que regulan la asociación entre estos orgánulos y para ello estamos analizando la dinámica de las proteínas GMAP-210 y AKAP-450, que juegan un importante papel en este proceso.

- **Ciclo Celular y Oncogénesis**

El control de la división y la migración de las células es asimismo esencial para asegurar la homeostasis de los tejidos y prevenir comportamientos inadecuados de las células que conducen al desarrollo de tumores y a la aparición de metástasis. El gen pttg1/sec parece estar involucrado en ambos procesos mediante diversos mecanismos de acción que incluyen su participación en la separación de cromátidas hermanas durante la mitosis, la parada del ciclo celular y la inducción de muerte celular en determinadas circunstancias e incluso ciertos mecanismos de reparación del ADN. La implicación de PTTG1 en estos procesos surge del establecimiento de interacciones específicas con las proteínas separasa, p53 o el autoantígeno Ku70/80. Además PTTG1 exhibe una potente actividad transactivadora cuyo estudio ha puesto de manifiesto el aumento de la expresión de ciertas quimioquinas y la represión de algunas moléculas de adhesión lo que sugiere una clara implicación en el proceso metastásico.

- **Señalización en la Muerte Celular**

La búsqueda de agentes capaces de inducir apoptosis en células tumorales ha sido una línea de enorme interés en los últimos años. El descubrimiento del ligando TRAIL como posible antitumoral ha llevado a numerosos grupos internacionales a investigar diversos aspectos relacionados con su biología y su aplicabilidad en clínica. Conocer los mecanismos de señalización de apoptosis y autofagia inducidos por el ligando TRAIL en células normales así como aquellas vías de señalización que pueden conferir resistencia a la acción de TRAIL en células tumorales es de primordial importancia. Por esto, examinaremos en profundidad la expresión de ciertos inhibidores de caspasas comparando sus niveles en células normales y tumorales. Igualmente, estamos interesados en desvelar los mecanismos intracelulares que controlan la expresión de TRAIL en células epiteliales normales de mama durante la formación del lumen mamario y si estos mecanismos son operativos tras la transformación tumoral. Los resultados que se obtengan de estos trabajos de investigación básica pueden contribuir a elaborar estrategias de tratamientos combinados basados en TRAIL e inhibidores de las vías de señalización implicadas en la resistencia a este ligando.

- Factores Neurotróficos y Enfermedades Neurodegenerativas

Por último, la degeneración celular que ocurre en determinadas situaciones patológicas puede también surgir como consecuencia de señalizaciones anómalas. El Amiloide beta (Ab), el componente principal de las placas seniles, ha sido considerado como un agente patogénico importante en el inicio y el progreso de la enfermedad de Alzheimer. El Amiloide beta es un producto natural generado por una doble rotura proteolítica de su proteína precursora. Datos recientes apuntan que el Amiloide beta podría desempeñar un papel fisiológico como factor neurotrófico. Nuestra intención es demostrar que una modificación en el comportamiento del Amiloide beta es responsable de transformar sus efectos fisiológicos en patológicos, alterando la vía de señalización que se activa tras su unión al receptor común de neurotrofinas p75NTR. Podría ocurrir que durante esta conversión, el Amiloide beta cambiara de comportarse como un agonista a hacerlo como un antagonista del factor de crecimiento nervioso, esto es, podría transformarse de agente neurotrófico en agente neurotóxico.

- Terapias Avanzadas en Neuroprotección

Básica orientada a la Enfermedad de Investigación

Caracterización de los mecanismos de regulación inmune, la neuroprotección y la neurodegeneración de péptidos bioactivos en los procesos inflamatorios o trastornos autoinmunes. Explotación terapéutica de péptido-funcionalizado, sistemas de administración de medicamentos basados en nanopartículas en los inflamatorios/enfermedades autoinmunes. La activación de células inmunitarias reguladoras endógenas como un enfoque hacia la terapia celular. Inmunológicas efectos y mecanismos de agregación de la proteína de enfermedades vinculadas y la función chaperona.

Investigación orientada al Paciente

Los estudios en pacientes que sufren esclerosis múltiple destinados a producir resultados de la investigación en la descripción de los estudios (por ejemplo, la metabolómica, el gen del antígeno o matrices) para entender mecanismos de la enfermedad desde la perspectiva de la biología de sistemas como un enfoque no invasivo para diagnosticar y determinar las enfermedades neurodegenerativas con una enfermedad autoinmune / componente inflamatorio. Esto podría permitir la evaluación de nuevas terapias en ensayos clínicos, la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar efectos adversos durante el tratamiento y la aplicación definitiva de las nuevas herramientas hacia una medicina más personalizada.

Inmunología Básica y de Investigación Traslacional

Nuestro sistema inmunológico interactúa constantemente con nuestro entorno interior, nos protege de nuestro medio ambiente externo y proporciona los conocimientos inherentes a sentir la diferencia entre amigos y enemigos. Por lo tanto, el sistema inmune es uno de los componentes de la carrocería más dinámica en la determinación de nuestro estado de salud o enfermedad. La importancia de los trastornos de base inmunológica se destaca por el hecho de que las enfermedades inflamatorias mediadas inmunológicamente se sabe que afectan a casi el 20 por ciento de la población de EE.UU. Estas condiciones, que incluyen la diabetes juvenil, la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, asma, lupus eritematoso sistémico y síndrome de inmunodeficiencia adquirida, llevan a una debilitación crónica, enfermedad de por vida, la morbilidad prolongada y resultar en grandes gastos médicos. El sistema inmune también tiene una participación importante en el rechazo post-trasplante y en la capacidad del cuerpo para combatir la invasión de las células cancerosas.

A pesar de estas enfermedades aparentemente inconexas, inmunólogos básicos están en una posición destacada para aprehender a un panorama más amplio bajo un paradigma coherente. Esta vanguardia de las futuras estrategias terapéuticas se basa en la aplicación exitosa de la inmunología genética, molecular y celular para prevenir, tratar y

curar los problemas causados por trastornos del sistema inmune-basadas. Los aspectos de la investigación traslacional que están directamente relacionados con la atención de los pacientes requieren integradas, las estrategias de participación de equipos multidisciplinarios especializados en la biología básica e investigación clínica, la ética y las cuestiones reglamentarias. Para aprovechar al máximo ese enfoque global, es esencial centrar los programas de investigación en un número limitado de los conceptos básicos bien validados comunes a la autoinmunidad, la alergia y el trasplante de órganos. Por lo tanto, cómo hacer cumplir mejor o al final la respuesta inmune en beneficio de los pacientes es, probablemente, el objetivo más emocionante para la terapia de hoy.

Líneas de Investigación

- La modulación de la inmunidad innata y adaptativa por actividad dependiente de neuroprotectoras.
- Proteína (ADNP) y los péptidos derivados de ADNP.
- Químicos de síntesis y caracterización biológica de nanopartículas metálicas protegidas- funcionalizados con péptidos bioactivos.
- Inmunológica efectos y mecanismos de agregación de la proteína de enfermedades relacionadas.

DEPARTAMENTO DE CÉLULAS TRONCALES, REPROGRAMACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

Las células troncales son un grupo de células clonogénicas, pluripotenciales y con capacidad de autorenovación. Las Células Troncales Embrionarias (CTE) son células pluri-potentes derivadas a partir de la masa interna de los blastocistos cuya capacidad de diferenciación y proliferación incluye cualquiera de los tipos celulares que se encuentran en el feto y en el adulto. Estas características son las que les confieren el tremendo potencial de aplicación clínica que tienen estas células, ya que supondrían una fuente ilimitada de células que se podrían trasplantar en los ensayos de terapia celular. Además, han demostrado su utilidad en ensayos de toxicidad de fármacos, como una alternativa al uso de animales de experimentación, en estudios sobre la biología del desarrollo y en investigaciones sobre la biología del cáncer. Por su origen, las células troncales se clasifican en células troncales de origen embrionario (CTE) y células troncales procedentes de tejidos adultos (CTA). En este segundo grupo nos encontramos con un listado largo de tipos celulares cuyas propiedades sugieren aplicaciones clínicas distintas. Se han descrito células troncales procedentes de la médula ósea (mesenquimales, MAPC), del cordón umbilical, del tejido adiposo (mesenquimales), de la placenta y líquido amniótico, de sangre periférica (monocitos), etc.

Los mecanismos de autorenovación han sido explorados con mayor detalle en las células de origen embrionario. Algunos factores transcripcionales tales como Oct4, Sox2 y NANOG tienen papeles importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado, y son llamados frecuentemente marcadores de poblaciones indiferenciadas de CTE. En las células troncales embrionarias de ratón el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) es importante en el mantenimiento de este estado. La acción del LIF comprende su interacción con un receptor heteromérico compuesto por la proteína gp130 y el receptor de baja afinidad de LIF (LIFR) para inducir la activación de la ruta de señalización JAK/STAT, ruta que tiene un papel esencial en el mantenimiento del estado indiferenciado. El blanco principal aguas abajo del LIF es el sistema c-myc que es activado por STAT3 y se ha propuesto que su acción está relacionada con la inducción de la expresión de la subunidad reguladora de la telomerasa. El LIF y los componentes del suero también inducen la activación de otras proteínas tales como las Src tirosinas quinasas (SFK) y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, las ERKs. La activación de las SFK es requerida para el mantenimiento de la indiferenciación y proliferación, su inhibición está relacionada con la disminución las proteínas Oct4, NANOG y de la actividad de fosfatasa alcalina. La contribución de la activación de ERK por el LIF en el mantenimiento de la indiferenciación no es clara.

Por otro lado, el LIF induce la activación del sistema PI3K/Akt, además se ha mostrado que participa en la regulación de la indiferenciación y la proliferación en las CTE de ratón, adicionalmente, ha sido descrito que la sobre-expresión de la forma activa de la Akt es suficiente para mantener el fenotipo de estas células. Recientemente se ha reportado que la inhibición de la GSK-3 es suficiente para mantener la indiferenciación y proliferación en CTE de ratón y CTE humanas, aspecto que es controvertido ya que se han descrito resultados en que las señales de la ruta de Wnt por sí solas no son suficientes para mantener el estado de indiferenciación y proliferación en las CTE de ratón, aunque sí incrementa el efecto del LIF. Reportes recientes han mostrado que la proteína morfogenética del hueso (BMP) y proteínas relacionadas con ésta son capaces de mantener el estado de indiferenciación y proliferación en CTE de ratón, sin embargo en CTE humanas promueven la diferenciación. Las CTE humanas son mantenidas y propagadas rutinariamente en estado indiferenciado en cultivos sobre capas nodrizas de fibroblastos inactivados o sobre matrices de proteínas extracelulares con medio condicionado en fibroblastos inactivados. La activación de STAT3 por el LIF y otras citoquinas no son suficientes para mantener la indiferenciación en CTE humanas. Algunos factores de crecimiento, como el bFGF, están comprometidos en este proceso. Altas concentraciones de bFGF exógeno son necesarias para mantener la indiferenciación de CTE humanas en ausencia de medio condicionado y la adición de Noggin, un antagonista de BMP, puede mejorar el efecto del bFGF. La adición de bFGF y Noggin a cultivos de larga duración en sistemas libres de células nodrizas, no tienen buen rendimiento.

La diferenciación *in vitro* utiliza estrategias basadas en la biología del desarrollo, fundamentalmente señales intra- y extracelulares. Las señales intracelulares consisten en la activación e inhibición de la expresión de genes reguladores del proceso, entre las señales extracelulares se han propuesto factores de crecimiento, contacto intercelular y componentes de la matriz extracelular.

Por último, la transferencia nuclear ha mostrado que el genoma de las células adultas de mamíferos es susceptible de ser reprogramado. Esta posibilidad abre numerosas estrategias basadas en la búsqueda de los factores responsables de dicha programación.

Actualmente está constituido por los siguientes grupos:

Chairman: Bernat Soria Escoms

- Grupo 1: Terapia Celular de la Diabetes Mellitus y sus complicaciones: Bernat Soria Escoms (IP, Director del Departamento)
- Grupo 2: Reprogramación y diferenciación de Células Troncales Adultas: Francisco Martín Bermudo (IP, Profesor Titular de Universidad, Universidad Pablo de Olavide)
- Grupo 3: Laboratorio de diferenciación celular (IP. Dr. Mario García Domínguez),
- Grupo 4: Desarrollo y regeneración de Islotes pancreáticos (IP, Dr. Benoit Gauthier)
- Grupo 5: ADN dañado: cáncer y neurodegeneración (IP. Dr. Felipe Cortés)

Líneas de Investigación

- **Terapia Celular de la Diabetes Mellitus y sus Complicaciones**

Los estudios de tipo prospectivo y epidemiológico (DCCT, UKPDS) han demostrado que el control intensivo de la glucemia en pacientes diabéticos adultos disminuye de forma significativa la aparición de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía). Sin embargo, la terapia intensiva con insulina aumenta el riesgo de sufrir hipoglucemias. El tratamiento intensivo intenta reproducir el control fisiológico (permanente, preciso y regulado) de la glucemia sanguínea, para ello, el paciente debe someterse a un control permanente de la glucemia y a la administración intensiva (4-6 veces día) de insulina, la tarea que el páncreas endocrino realiza de forma continua es sustituida por la conducta de un paciente entrenado y motivado. Los distintos modelos de "bombas de insulina" representan una aproximación similar. Sin embargo, una terapia que conduzca a que no se pierda o se recupere la homeostasis de la glucosa en la Diabetes Mellitus tipo 1 sólo puede venir de: la protección de destrucción de la población celular beta mediante la predicción y prevención de su desaparición, la reposición de la población celular beta mediante la terapia celular sustitutiva o la regeneración pancreática. Hasta el momento, los estudios de predicción y prevención no han dado resultados positivos.

En trabajos previos de colaboración de los miembros del grupo hemos mostrado que las células madre embrionarias (ES) adquieren *in vitro* un fenotipo pancreático endocrino y/o acinar. También hemos identificado varios factores solubles que permiten iniciar la diferenciación dirigida al incrementar ambos procesos. Tras selección genética utilizando constructos químicos en los que el promotor del gen de la insulina o del factor de transcripción NKx6.1 está fusionado al gen de resistencia a la neomicina y el de X-Gal. Por otra parte, hemos demostrado que la diferenciación hacia ectodermo permite obtener células que producen insulina, pero carecen de otros rasgos del fenotipo pancreático.

Objetivos

- Obtención de cultivos libres de contaminantes de origen no humano.
- Obtención de líneas celulares comprometidas con la diferenciación hacia endodermo.
- Obtención de Endodermo Definitivo, Progenitores Pancreáticos y Células Beta Pancreáticas.
- Selección, caracterización y trasplante de Linajes Celulares.
- Reprogramación de células madre utilizando transportadores del tipo Chariot y la aplicación de medio citosólico de células productoras de insulina tratados con RNAasa y DNAasa.
- Estudio molecular de las células generadas mediante microarrays: identificación de genes implicados en la diferenciación endocrina.
- Rescate funcional utilizando las células generadas en modelos animales de diabetes.
- Estudio de la regeneración pancreática utilizando modelos de regeneración exentos de procesos inflamatorios.
- Estudio de la inestabilidad del genoma, organización de la cromatina y modificaciones epigenéticas durante los procesos de reprogramación y diferenciación.
- Obtención de cardiomocitos humanos a partir de células troncales embrionarias.

- Obtención de precursores endoteliales a partir de grasa humana.
 - Obtención y ensayo clínico y experimental de composiciones celulares útiles en el tratamiento de las complicaciones cardiovasculares de la Diabetes Mellitus (insuficiencia cardiaca, pie diabético).
 - Inducción de tolerancia en terapia celular.
- **Reprogramación y Diferenciación de Células Troncales Adultas**

Los estudios que desarrolla el Departamento giran en torno al doble origen de estas células. Las líneas de trabajos relacionadas con las células troncales embrionarias cubren los siguientes aspectos:

- Diseño de protocolos para la obtención de líneas celulares humanas (CTE) procedentes de embriones portadores de enfermedades monogénicas y de animales transgénicos modelos de patologías o como instrumento para estudios de regeneración en animales.
- Diseño de protocolos para la obtención de líneas celulares humanas (CTE) en condiciones GMP utilizando técnicas de cultivo exentas de monocapa nodriza de fibroblastos y medios exentos xenoproductos.
- Estudio de los procesos moleculares responsables del mantenimiento del grado de indiferenciación, pluripotencialidad y autorenovación de células troncales.
- Desarrollo de protocolos de diferenciación *in vivo* e *in vitro* de las mismas.

En cuanto a las células troncales de origen adulto, las líneas a desarrollar son:

- Búsqueda de tejidos apropiados para la obtención de células troncales.
- Identificación de marcadores y propiedades que nos permitan identificar estas células.
- Desarrollo de protocolos de cultivo y de diferenciación de las mismas.
- Análisis de su capacidad de expansión y plasticidad.

- Estudio de los procesos de transdiferenciación y, más específicamente, de los procesos de reprogramación que permiten la adquisición de pluripotencialidad en células procedentes de tejidos adultos.
- Por último, el potencial uso clínico de las células troncales exige que se investigue en los procedimientos y métodos para la producción de células de grado clínico. En este sentido en CABIMER se ha construido y puesto en funcionamiento una Unidad de Producción Celular que cumple con los criterios GMP.
- **Laboratorio de Diferenciación Celular**

El estudio de las células troncales es de gran interés en la actualidad. Debido a su carácter pluripotente, la aplicación de protocolos adecuados de diferenciación permite derivar una gran diversidad de células especializadas a partir de las células troncales. Este potencial resulta de enorme interés en la aplicación de terapias celulares en el ámbito de la medicina regenerativa. Para la elaboración de protocolos específicos de diferenciación, así como para la desprogramación y reprogramación celular se necesita un conocimiento profundo a nivel molecular y genético de los procesos de proliferación y diferenciación celular. En nuestro grupo estamos interesados en el estudio de la coordinación entre ambos procesos. El desarrollo embrionario constituye el modelo ideal para el estudio de estos procesos y de la coordinación entre ellos. Una parte importante de nuestra investigación se centra en la diferenciación neuronal. Además del embrión de ratón y de pollo, utilizamos como modelo de investigación líneas celulares susceptibles de diferenciación *in vitro*, especialmente células troncales.
- **Desarrollo y Regeneración de Islotes Pancreáticos**

La homeostasis de glucosa en sangre se consigue con la regulación de la secreción de insulina y glucagón de las β de islotes pancreáticos y células α . La Diabetes Mellitus, que comprende un grupo heterogéneo de trastornos hiperglucémicos, se debe principalmente a la masa inadecuada y la función de los islotes β -células. La destrucción autoinmune de las células β causa la diabetes tipo 1 mientras que el tipo 2 se caracteriza por la secreción de insulina alterada y se asocia a menudo con la disminución de la acción de la insulina en los

tejidos. Al igual que la diabetes tipo 1 una pérdida gradual de la masa de células β se observa también en la diabetes tipo 2, requiriendo a menudo terapia con insulina. La comprensión del mecanismo molecular que regula la supervivencia de las β -células y la regeneración, así como su función pueden proporcionar medios para desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de la diabetes.

Proyectos de Investigación

- El impacto funcional de los islotes pancreáticos Pax4 en masa de células β .
 - β -células expansión de la regulación epigenética.
 - El papel de la β -Pdx1 en función de la célula y la supervivencia.
 - La implicación de Pax8 en la expansión de los islotes durante el embarazo.
 - LRH-1 y la fisiología del islote.
- **ADN dañado: Cáncer y Regeneración**

Los cambios topológicos inherentes a todos los procesos fundamentales que implican a la molécula de ADN, incluyendo tanto la transcripción, replicación y reparación como la condensación y segregación cromosómica. Sin embargo su ciclo catalítico emplea un mecanismo de rotura transitoria y religación, que si se ve interrumpido puede dar lugar a roturas persistentes con la enzima unida covalentemente a los extremos 3' o 5' del corte, una estructura aberrante que puede comprometer la supervivencia celular y/o la integridad del genoma con las consiguientes implicaciones en tumorigénesis. La acción abortiva de la topoisomerasa I (Top1) genera roturas de cadena sencilla (SSBs), e indirectamente roturas de cadena doble (DSBs), con la enzima unida al 3' del corte, mientras que la topoisomerasa II (Top2) da lugar directamente a DSBs con la enzima unida al 5'. Esta peculiaridad del mecanismo de acción de las topoisomerasas es además la base de la eficacia antitumoral de los llamados "venenos de topoisomerasas", que permiten a la enzima llevar a cabo la rotura del ADN pero inhiben la reacción de religación, induciendo así roturas en el ADN que afectan preferentemente a las células tumorales, ya sea por su alto índice de proliferación como por carecer frecuentemente de algunos mecanismos de reparación. Además de esta interesante relación con la terapia del cáncer, se ha

demostrado que defectos en la reparación de roturas generadas por topoisomerasas pueden ser la causa de ciertas enfermedades neurodegenerativas progresivas.

REPARACIÓN DE ROTURAS GENERADAS POR TOPOISOMERASAS

La peculiaridad que distingue a las roturas generadas por topoisomerasas de otro tipo de roturas en el ADN es la presencia de la enzima unida covalentemente a los extremos del corte mediante un enlace fosfotirosínico. Estos impedimentos proteicos deben eliminarse y permitir así el acceso a enzimas implicadas en los mecanismos generales de reparación de roturas. La “tyrosyl DNA phosphodiesterase 1” (TDP1) se encarga de romper específicamente el enlace fosfotirosínico cuando ocurre en el extremo 3' del ADN, típico de Top1, pero no en el extremo 5', típico de la Top2, a pesar de ser hasta hace poco la única actividad con estas características descrita. Además de este mecanismo específico, la célula cuenta con nucleasas tales como el complejo MRN, CtIP, ARTEMIS, FEN1 o XPF/ERCC1 que pueden eliminar las topoisomerasas cortando directamente en la molécula de ADN. Sin embargo, este mecanismo alternativo para liberar las roturas de topoisomerasas “atascadas” presenta ciertos inconvenientes. Por un lado, la actividad de algunas de estas nucleasas parece estar sujeta a regulación dependiente del ciclo celular, de forma que no están activas en G1 y por consiguiente tampoco en tejidos no proliferativos. Por otro lado, la acción de nucleasas en los extremos de una rotura constituye en principio una pérdida de información genética que, aunque puede subsanarse, aumenta la probabilidad de mutaciones y reordenaciones cromosómicas.

HIPÓTESIS DE PARTIDA

Como hemos mencionado anteriormente, comprender en su totalidad los mecanismos que rigen la reparación de daño inducido por topoisomerasas y su regulación adquiere una importancia fundamental para avanzar en la comprensión de dos procesos que constituyen una gran preocupación por su alta incidencia y gravedad en cuanto a la salud humana: (a) el cáncer, ya sea en lo que se refiere a su origen como su terapia, y (b) las enfermedades neurodegenerativas.

La eliminación de la proteína de los extremos de una rotura en el ADN constituye el evento que caracteriza la reparación de daño generado por topoisomerasas, y puede ocurrir tanto por acción de una “tyrosyl DNA phosphodiesterase” (TDP) como por un corte nucleolítico. En nuestro modelo de trabajo la

actividad TDP es importante para mantener la estabilidad genómica, asegurando la correcta reparación de las roturas generadas por topoisomerasas. En cambio, la actividad nucleolítica aumenta la probabilidad de mutaciones y reordenaciones cromosómicas, con el correspondiente impacto en carcinogénesis. Además, la acción de TDPs puede ser especialmente importante para evitar la acumulación de daño y asegurar la supervivencia de células post-mitóticas altamente diferenciadas y de larga vida como son las neuronas, en las que los mecanismos nucleolíticos pueden estar reducidos. Así, cáncer y neurodegeneración pueden ser dos caras de una misma moneda, de forma que defectos en la reparación de daño pueden manifestarse como muerte celular y degeneración en tejidos no proliferativos por la falta de mecanismos alternativos de reparación, y como inestabilidad genética en tejidos proliferativos por las posibles consecuencias mutagénicas de dichos mecanismos.

ANTECEDENTES Y RESULTADOS PREVIOS

La enfermedad neurodegenerativa progresiva ataxia espinocerebelosa con neuropatía axonal 1 (SCAN1) está asociada a una mutación en TDP1, lo que ilustra la importancia de reparar el daño generado por topoisomerasas. La ausencia de TDP1 provoca sensibilidad a los “venenos” de Top1, mientras que su sobreexpresión se ha visto asociada a la resistencia de ciertos tumores a este tipo de agentes. Estas observaciones han colocado a TDP1 como una posible diana quimioterapéutica de la que ya se están desarrollando inhibidores específicos.

Nuestro trabajo reciente ha servido para identificar en células humanas la primera TDP de extremos 5' a la que hemos llamado TDP2. Hemos observado que la depleción de TDP2 mediante ARN de interferencia tanto en una línea tumoral como en fibroblastos primarios humanos produce una acumulación de DSBs y mayor sensibilidad en respuesta a un tratamiento con el “veneno” de Top2 etopósido. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la actividad TDP para reparar roturas generadas por Top2, de manera análoga a lo ya conocido para TDP1 y lesiones mediadas por Top1. Consideramos por tanto que TDP1 y TDP2 son actividades enzimáticas complementarias que proporcionan a la célula la capacidad eliminar de forma eficaz y segura las topoisomerasas unidas a los extremos de roturas de ADN. La reciente identificación de TDP2 nos proporciona un nicho en el que establecer nuestra línea de investigación independiente en este campo tan competitivo, con la ventaja de contar con numerosas herramientas, entre las cuales cabe destacar un nuevo modelo de ratón *Tdp2-/-*.

OBJETIVOS

1- Caracterización del modelo de ratón *Tdp2*-/-

El modelo de ratón *Tdp2*-/- es un factor importante en nuestro plan experimental, cuya caracterización, además de constituir un objetivo en sí mismo, debe contribuir a la consecución de varios de los objetivos que se enumeran a continuación. Por un lado, nos dará la posibilidad de analizar el efecto de una ausencia total de TDP2 en diferentes cultivos celulares primarios. Por otro lado, estudiaremos las consecuencias de una carencia de TDP2 *in vivo* donde prestaremos especial atención a un posible aumento en la incidencia de cáncer y neurodegeneración, tanto de forma espontánea como inducida por “venenos de topoisomerasa”.

2- Caracterización bioquímica y celular de la función de TDP2

Consideramos que además del estudio de factores directamente relacionados con cáncer y neurodegeneración debemos prestar atención a aspectos más mecanísticos de la función de TDP2, su posible regulación y cómo se integra en otros procesos celulares. Incluirímos un análisis de los siguientes aspectos:

- Substrato fisiológico de TDP2
- Regulación de la actividad de TDP2
- Interacciones de TDP2
- Función de TDP2 en mecanismos de reparación de DSBs
- Redundancia de TDP2 con nucleasas celulares

3- TDP2 y Cáncer

Por un lado nos planteamos la posibilidad de que defectos en TDP2 puedan estar asociados a predisposición al cáncer. Por otro lado analizaremos una posible correlación entre la expresión o la actividad de TDP2 y la respuesta de diferentes líneas tumorales a “venenos de topoisomerasas”.

4- Roturas producidas por topoisomerasas y neurodegeneración

Nos centraremos en dos aspectos: la posibilidad de que la acumulación de lesiones de Top2 sin reparar pueda disparar la muerte neuronal, de forma que un defecto en TDP2 tenga consecuencias análogas al de TDP1 en SCAN1; y la importancia de TDP2 en reparar daño generado por Top1 en ausencia de TDP1 y por lo tanto en los pacientes SCAN1.

DEPARTAMENTO DE TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

Durante el desarrollo y la regeneración tisular, la proliferación y diferenciación celular junto con la morfogénesis, dan lugar a estructuras complejas. La regulación de estos procesos es función de la información genética y de las instrucciones epigenéticas. En condiciones fisiológicas las aves y los mamíferos aumentan su masa hasta alcanzar un determinado tamaño en el cual se estabilizan, pero esto no es así en todos los vertebrados; muchos crustáceos y peces continúan aumentando su peso a lo largo de toda su vida. En los mamíferos adultos existen numerosos tejidos que necesitan ser renovados continuamente, como la sangre, la piel y el epitelio intestinal. Otros órganos como el hígado, pueden regenerarse en determinadas condiciones, por ejemplo, el hígado tras una hepatectomía parcial, o el hueso que está sometido a un proceso de remodelación continua. etc.

Allí donde hay renovación de células y regeneración celular es porque las células pueden dividirse o porque hay células troncales y/o progenitoras que van renovando las células que desaparecen. Además de la presencia de células madre y/o progenitoras comprometidas con un tejido sometido a un proceso de renovación constante o con cierta capacidad de regeneración o de aumento de masa, en los últimos años se han encontrado células troncales en tejidos que hasta entonces se consideraba que no poseían capacidad de dividirse (sistema nervioso) y, sobre todo, se ha descrito en estas u otras células una plasticidad hasta entonces desconocida. En ensayos clínicos recientes se ha observado que determinadas composiciones celulares procedentes de médula ósea pueden activar procesos de regeneración de base aún desconocida tras el infarto de miocardio.

Este departamento, liderado por el Dr. Shomi Bhattacharya, asume la aplicación de los resultados en terapia celular y medicina regenerativa así como la transferencia de estos conocimientos hacia el sistema sanitario, con el objetivo de mejorar la salud de los ciudadanos. La terapia celular tiene como

objetivo la sustitución de las células dañadas por otras nuevas. En este sentido, cobran una gran importancia las células madre (embrionarias, adultas y fetales) y su capacidad para desarrollarse en células de cualquier tipo de tejido. Además, las células madre poseen otras aplicaciones terapéuticas, como el ensayo toxicológico y farmacológico y el estudio de las primeras fases en la aparición de determinadas enfermedades genéticas.

Este departamento plantea inicialmente líneas de investigación en ámbitos como la regeneración pancreática y terapia celular contra la Diabetes Mellitus, la inmunología e inducción a la tolerancia, en oncología y patología molecular, en ingeniería tisular y biomateriales y en trasplantes y regeneración en vertebrados.

Está constituido por los siguientes grupos:

Chairman: Shomi Bhattacharya

- Grupo 1: Degeneración de la Retina: de la genética a la terapia (IP, Shomi Bhattacharya, Director del Departamento y Director de CABIMER).
- Grupo 2: Supervivencia de Islotes Pancreáticos: Francisco J. Bedoya Bergua (IP, Catedrático de Universidad, Universidad Pablo de Olavide).
- Grupo 3: Terapia Celular de Neuropatologías (IP, científico titular Manuel Álvarez).
- Grupo 4: Terapias Avanzadas en Neuroprotección (IP, científico titular David Pozo).
- Grupo 5: DNA double strand breaks repair and human disease. (IP, científico titular Pablo Huertas)

Líneas de Investigación

- **Degeneración de la Retina: de la genética a la terapia**

La genética molecular define un campo de estudio en el que, en ausencia de un defecto bioquímico detectable (válido para la mayoría de las enfermedades hereditarias), un enfoque de la genética inversa permite la asignación cromosómica y el aislamiento de los genes que causan la enfermedad. El advenimiento de la tecnología del ADN recombinante permitió la

clonación de marcadores cromosómicos específicos de ADN en la década de los 80'. La capacidad de detectar polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) en el genoma humano permite el uso de estos marcadores como herramientas para los estudios de ligamiento genético en familias segregantes para un rasgo particular de la enfermedad. Las enfermedades hereditarias que afectan la retina son causa importante de ceguera incurable en el mundo occidental. Entre ellas, una proporción significativa se explica por un grupo clínicamente heterogéneo de enfermedades conocidas colectivamente como retinosis pigmentaria (RP). RP es inicialmente caracterizada por ceguera nocturna y pérdida progresiva de la visión periférica debido a la pérdida de las células de bastones. Conforme avanza la enfermedad las células del cono en la retina central también están involucrados, a menudo conduce a la ceguera total en etapas avanzadas de la enfermedad.

Basado en el análisis de pedigrí se han verificado los tres modos de herencia mendeliana (autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X-). Décadas de investigación sobre las bases bioquímicas de la enfermedad no pueden identificar ni un solo factor causal. A tal efecto, clínicamente para este programa la caracterización de grandes linajes han sido esenciales al igual que una serie de servicios oftalmológicos a nivel nacional e internacional han sido fundamentales. La clonación posicional ha conducido posteriormente a la identificación y caracterización de muchos de los genes de las enfermedades oculares hereditarias.

- **Supervivencia de los Islotes de Langerhans**

La evidencia acumulada por un número considerable de artículos experimentales y clínicos indica que un descenso relativo o absoluto de la masa de células β pancreáticas es el común denominador de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Las células β poseen un capacidad adaptativa apreciable que le permite hacer frente a situaciones de demanda funcional incrementada (embarazo, obesidad) o a situaciones de escasa demanda (como puede ser en el ayuno) modulando su respuesta secretora y modificando su masa celular. Esta plasticidad del sistema secretor de insulina y de la masa celular se ve comprometida en las diversas formas de diabetes en el ser humano. Una estrategia terapéutica eficiente debería combinar el control de los factores causales de la enfermedad junto con la protección de la masa de célula β residual y la atenuación de los factores agravantes (control glucémico, control del sobrepeso, etc.).

En la actualidad, se estudia el papel de ciertos factores de crecimiento y hormonas gastrointestinales sobre la regulación de la masa de células β , tanto en animales transgénicos con mutaciones en receptores para algunos de estos factores como en estudios *in vitro* en islotes aislados. Los resultados que hemos generado en nuestro laboratorio a lo largo de los últimos 10 años han mostrado una doble función del Óxido Nítrico (NO) como protector a bajas concentraciones y como inductor de la apoptosis a altas concentraciones en la homeostasis de la célula β pancreática. En ambas situaciones, la regulación de la expresión de genes proapotóticos y antiapoptóticos es antagónica.

Con los antecedentes anteriormente expuestos, pensamos que es interesante estudiar el papel del sistema del NO en la señalización protectora de factores de crecimiento del tipo de la insulina, IGF-1, GLP-1, y su agonista la exendina, etc. Para ello nos fundamentamos en tres ideas: 1) Se ha descrito en la literatura científica que la insulina estimula la producción de NO por las células endoteliales y se ha propuesto que la resistencia a esta hormona puede estar implicada en las alteraciones vasculares que tienen lugar en la diabetes. 2) La célula β del páncreas tiene receptores para la insulina y responde al IGF-1, así como al GLP-1 y a su agonista la exendina. 3) El islote pancreático es un micro órgano muy vascularizado y su flujo sanguíneo está controlado por nutrientes (glucosa) y por factores hormonales del tipo de la angiotensina II.

Líneas de Investigación

- Caracterización del efecto protector de factores extracelulares como la insulina, el IGF-1, el glucagón, el GLP-1, etc. frente a la apoptosis de la célula beta pancreática.
- Papel del NO como mediador de la señalización protectora en la célula beta.
- Identificación de la señalización intracelular activada por el NO.
- Caracterización de la acción del NO en el control de los procesos de autorrenovación y diferenciación de las células troncales.

- **Terapia Celular de Neuropatologías**

Nuestro laboratorio tiene como objetivo el estudio de diversas células madre (CM), tanto adultas como fetales, para su posible aplicación en Medicina Regenerativa. Estudiamos los mecanismos que emplean dichas CM para regenerar tejido dañado y desarrollamos estrategias de trasplante que puedan ser útiles en el tratamiento de distintas neuropatologías, como la ataxia, el ictus o la epilepsia.

La Ataxia es una enfermedad denominada rara al afectar a un reducido número de personas, pero no por ello menos importante. Los enfermos se caracterizan por su incapacidad de coordinar movimientos debido a una degeneración progresiva del cerebelo. Conlleva pérdida de la locomoción, habla y a largo plazo problemas cardiacos y la muerte. Estamos desarrollando un tratamiento mediante trasplante de CM adultas derivadas de la MO que, a través de un mecanismo de fusión celular de reciente descubrimiento, podría revertir las mutaciones que causan algunos tipos de Ataxia.

Por contra, el accidente cerebro-vascular o ictus es una de las enfermedades más frecuentes en las sociedades modernas. En los últimos años, se ha empezado a usar células de la MO en el tratamiento de modelos animales con ictus. Varios grupos han observado una mejora en los síntomas post-isquémicos, que se ha asociado a la aparición de nuevos vasos en la zona de penumbra y la secreción por parte de las células de MO de una serie de factores tróficos, pro-neurogénicos y anti-apoptóticos. En el laboratorio estudiamos el mecanismo por el que se forman los nuevos vasos y comprobamos si las CM derivadas de la MO pueden ser utilizadas como vectores para el transporte de fármacos paliativos.

La tercera patología que nos interesa es la Epilepsia, que afecta al 1% de la población y supone un trastorno crónico que impide el normal desarrollo cerebral y psíquico del individuo, dificultando enormemente su plena integración sociolaboral. Afecta a sectores muy jóvenes, tiene tratamientos muy costosos y una gran carga familiar. Actualmente existen tratamientos farmacológicos con una eficacia aceptable, pero sólo palian los síntomas y en muchos casos se desarrollan farmacoresistencias, por lo que se muestran inútiles. La terapia celular,

mediante el uso de precursores neuronales fetales, podría curar definitivamente las crisis epilépticas y supone una alternativa terapéutica para los pacientes fármaco-resistentes.

Líneas de Investigación

- Fusión Celular como Mecanismo Neuroregenerativo.
 - Terapia Celular para la Ataxia Mediante Células Madre Adultas de MO.
 - Papel de la Fusión Celular en la Regeneración del Ictus.
 - Trasplante de Precursores Neuronales de la MGE para el Tratamiento de la Epilepsia.
- **Reparación de cortes de doble cadena en el DNA y Patologías Humanas**

Los cortes de doble cadena (DSBs) son la lesión del DNA más citotóxica. Cuando no son reparados, los cortes de doble cadena provocan la muerte celular y, por ello, son usados de forma habitual en los tratamientos contra el cáncer. Además, si dichos cortes de doble cadena son reparados de forma errónea, inducen un aumento de la inestabilidad genética, una de las causas principales en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades. Por lo tanto, el entender como las células reparan los cortes de doble cadena facilitaría la comprensión de cómo se desarrolla el cáncer y daría pistas sobre posibles mejoras en su tratamiento. Los cortes de doble cadena pueden ser reparados de dos maneras distintas, mediante non-homologous end-joining (NHEJ) o recombinación homóloga (HR). El uso de uno u otro está altamente regulado y depende de multitud de factores, siendo el más relevante la posición dentro del ciclo celular. De hecho, el uso de cualquiera de ellos en un momento inadecuado - desde el punto de vista del ciclo celular - genera un aumento de la inestabilidad genómica. A pesar de su importancia para el mantenimiento del genoma, es escaso lo que se conoce acerca de cómo se regula la elección de uno u otro modo de reparar los cortes de doble cadena.

Para ahondar en este problema, trabajamos con dos líneas principales de investigación:

- Búsqueda de nuevos factores que influencian el uso de uno u otro modo de reparar los cortes de doble cadena. Usando en un ensayo basado en proteínas fluorescentes que hemos desarrollado, estamos buscando nuevos factores que

modulan el uso de NHEJ o HR. Se pondrá especial énfasis en factores relacionados con la regulación del ciclo celular. Posteriormente, vamos a usar dicho ensayo para buscar productos químicos que alteren la relación entre el uso de NHEJ y HR mediante el uso de librerías de moléculas pequeñas.

- Un factor clave en la elección de HR o NHEJ es la proteína CtIP. Dicha proteína actúa como un integrador de múltiples señales relacionadas con el ciclo celular e interacciona con múltiples oncogenes (Rb, Brca1,...) y factores de proliferación celular (PCNA). Además, hemos demostrado recientemente que mutaciones en CtIP son los causantes de una variante del síndrome de Seckel, un tipo de enanismo hereditario. Mediante el uso de mutantes puntuales en CtIP que alteran dichas señales y/o su capacidad de interactuar con estos factores estamos aumentando nuestro conocimiento en esta elección entre HR y NHEJ mediada por CtIP que es clave para la estabilidad del genomio.

1.- Proyectos de investigación activos financiados con cargo a convocatorias públicas con concurrencia competitiva

Título del proyecto: Modulación en el Contexto del Ciclo Celular del Tipo de Reparación de Cortes de Doble Cadena en el DNA en Eucariotas Superiores

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2010-14877

Entidades participantes: Universidad de Sevilla

Duración, desde: 1/1/2011 hasta: 31/12/2013

Cuantía de la subvención: € 181.500

Investigador responsable: Pablo Huertas

Número de investigadores participantes: 2

Título del proyecto: Relevance of double strand break repair pathway choice in human disease and cancer

Entidad financiadora: European Research Council, ERC StG.

Duración, desde: 0/1/2012 hasta: 31/12/2016

Cuantía de la subvención: €1.416.866

Investigador responsable: Pablo Huertas

Número de investigadores participantes: 5

2.- Publicaciones desde la creación del grupo de investigación

P. Qvist*, P. Huertas*†, S. Jimeno, M. Nyegaard, M. J. Hassan, S.P. Jackson† and A.D. Børglum†, 2011.

*CtIP mutations cause Seckel and Jawad syndromes***PLOS Genetics**7(10):e1002310. (*Authors contributed equally to this work. † Corresponding authors).

3.- Ponencias y comunicaciones presentadas en congresos y reuniones científicas desde la creación del grupo de investigación

Huertas, P. Regulation of DNA doublestrand break repairpathways.

RecombinationMechanisms and GenomelInstability. Jerez, España, 2012.

Producción Científica

Publicaciones 2011 (desde junio de 2011)

- Kai Hui Hu He; Petra I. Lorenzo; Thierry Brun; Carmen M. Jiménez Moreno; Deborah Aeberhard; Jorge Vallejo Ortega; Marion Cornu; Fabrizio Thorel; Asllan Gjinovci; Bernard Thorens; Pedro L. Herrera; Paolo Meda; Claes B. Wollheim and Benoit R Gauthier, 2011. In Vivo Conditional Pax4 Overexpression in Mature Isle β -Cells Prevents Stress-Induced Hyperglycemia in Mice Diabetes. 2011 Apr 26.
- Díaz de la Loza M. C.; Gallardo M.; García-Rubio M.; Izquierdo A.; Herrero E.; Aguilera A. and Wellinger R. E. 2011. Zim17/Tim15 Links Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis to Nuclear Genome Stability. Nucleic Acids Res. 2011 Apr 21.
- Recio J. S.; Álvarez-Dolado M.; Díaz D.; Baltanás F. C.; Piquer-Gil M.; Alonso J. R. and Weruaga E. 2011. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. Cell Transplant. 2011 Feb 3.

- León-Quinto T.; Simón M. A.; Sánchez A.; Martín F. and Soria B. 2011. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology*, Vol. 62 (2): 145-151.
- Erceg S.; Moreno-Manzano V.; Garita-Hernández M.; Stojkovic M. and Bhattacharya S. S. 2011. Stem Cells for the Treatment of Cerebellar Related Disorders *Stem Cells* – Pending 29th marzo.
- Baquié M.; St-Onge L.; Kerr-Conte J.; Cobo-Vuilleumier N.; Cederroth C. R.; Nef S.; Borot S.; Bosco D.; Marchetti P.; Pattou F.; Wollheim C. B. and Gauthier B. R. 2001. The Liver receptor homolog-1 (LRH-1) is expressed in human islets and protects beta cells against stress-induced apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2011 May 11.
- Ruiz J. F.; Gómez-González B. and Aguilera A. 2011. AID induces double-strand breaks at immunoglobulin switch regions and c-MYC causing chromosomal translocations in yeast THO mutants. *PLoS Genet* 7(2):e1002009.
- Domínguez-Sánchez M. S.; Sáez C.; Japón M. A.; Aguilera A. and Luna R. 2011. Differential expression of THOC1 and ALY mRNP biogenesis/export factors in human cancers. *BMC Cancer*, 11-77.
- Jimeno S.; Tous C.; García-Rubio M. L.; Ranes M.; González-Aguilera C.; Marín A.; and Aguilera A. 2011. New suppressors of THO mutations identify Thp3 (Ypr045c)-Csn12 as a protein complex involved in transcription elongation. *Mol Cell Bio* 31(4):674-85.
- Tous C.; Rondón A. G.; García-Rubio M.; González-Aguilera C.; Luna R. and Aguilera A. 2011. A novel assay identifies transcript elongation roles for the Nup84 complex and RNA processing factors. *EMBO J* 30(10):1953-64.
- Mischo H. E.; Gómez-González B.; Grzechnik P.; Rondón A. G.; Wei W.; Steinmetz L.; Aguilera A. and Proudfoot N. J. 2011-05-24. Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability. *Mol Cell* 41(1):21-32.
- Valerio-Santiago M; Monje-Casas F, 2011. Tem1 localization to the spindle pole bodies is essential for mitotic exit and impairs spindle checkpoint function. *The Journal of Cell Biology* 192(4): 599-614.

- García Jurado G.; Llanes D.; Moreno A.; Soria B. and Tejedo J. R. 2011. Monoclonal antibody that recognizes a domain on heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and PTB-associated splicing factor. *Hybridoma* Vol. 30 (1): 53-59.
- Ruiz-Salmeron R.; de la Cuesta-Díaz A.; Constantino-Bermejo M.; Pérez-Camacho I.; Marcos-Sánchez F.; Hmadcha A. and Soria B. 2011. Angiographic demonstration of Neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Cell Transplantation*.

Publicaciones 2012 (hasta junio de 2012)

- Peña A.; Gewartowski K.; Mroczeck S.; Cuéllar J.; Szykowska A.; Prokop A.; Czarnocki-Cieciura M.; Piwowarski J.; Tous C.; Aguilera A.; Carrascosa J. L.; Valpuesta. 2012. Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor. *EMBO J.* 31(6):1605-16.
- García-Rubio M. L.; Aguilera A. 2012. Topological constraints impair RNA polymerase II transcription and causes instability of plasmid-borne convergent genes. *Nucleic Acids Res.* 40(3):1050-64.
- García-Rodríguez N.; Díaz de la Loza M. D.; Andreson B.; Monje-Casas F.; Rothstein R.; Wellinger R. E. 2012. Impaired manganese metabolism causes mitotic misregulation. *The Journal of Biological Chemistry*. PMID:22493290.
- Erceg S.; Lukovic D.; Moreno-Manzano V.; Stojkovic M.; Bhattacharya S. S. Derivation of cerebellar neurons from human pluripotent stem cells. 2012. *Curr Protoc Stem Cell Biol* PMID: 22415839.
- Martín M.; Menéndez P. 2012. Biological impact of human embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 741:217-30.
- Cobo-Vuilleumier N. ; Gauthier B. R. 2012. PARP-1 & citokine-mediated B-cell damage: A nick in the Okamoto model. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* PMID: 22569074.

- Muñoz-Galván S.; Tous C.; Blanco M. G.; Schwartz E. K.; Ehmsen K. T.; West S. C.; Heyer W. D.; Aguilera A. 2012. Distinct roles of mus81, yen1, slx1-slx4, and rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.* 32:1592-1603.
- Aguilera A.; García-Muse T. 2012. R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Mol. Cell.* 46(2):115-24.
- Clemente-Ruiz M.; Prado F. 2012. Nucleosome assembly and genome integrity. *BioArchitecture*, 2(1): 6-10.
- Yerbes R.; López-Rivas A. 2012. Itch/AIP4-independent proteasomal degradation of cFLIP mediates sensitization of breast tumor cells to TRAIL by the histone deacetylase inhibitor SAHA. *Investigational New Drugs*. 30(2):541-7.
- Martín-Pérez R.; Niwa M.; López-Rivas A. 2012. ER stress sensitizes cells to TRAIL through down-regulation of FLIP and Mcl-1 and PERK-dependent up-regulation of TRAIL-R2. *Apoptosis*. (4):349-63.
- Rodríguez-Vargas J. M.; Ruiz-Magaña M. J.; Ruiz-Ruiz C.; Muñoz-Gámez J. A.; Siles A.; López-Rivas A.; Jaatela M.; Oliver F. J. 2012. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Research*.
- Yerbes R.; López-Rivas A.; Reginato M. J.; Palacios C. 2012. Control of FLIPL expression and TRAIL resistance by the extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 pathway in breast epithelial cells. *Cell Death Differ*.
- Ceballos-Chávez M.; Rivero S.; García-Gutiérrez P.; Rodríguez-Paredes M.; García-Domínguez M.; Bhattacharya S.; Reyes J. C. 2012. Control of neuronal differentiation by sumoylation BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (21):8085-90.
- Ferrández N.; Caraballo J. M.; García-Gutiérrez L.; Devgan V.; Rodríguez-Paredes M.; Lafita M. C.; Bretones G.; Quintanilla A.; Muñoz-Alonso M. J.; Blanco R.; Reyes J. C.; Agell N.; Delgado M. D.; Dotto G. P.; León J. 2012. P21 is a co-repressor of cyclin E2 and mitotic control genes. *Plos One*.

- García-Rodríguez N.; Díaz de la Loza M. C.; Andreson B.; Monje-Casas F.; Rothstein R. and Wellinger R. E. 2012.
Impaired manganese metabolism causes mitotic misregulation. *J Biol Chem.*
- Cobo-Vuilleumier N. ; Gauthier B. R. 2012.
PARP-1 and cytokine-mediated β -cell damage: A nick the Okamoto model?. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
- Mellado-Gil J. M.; Cobo-Vuilleumier N.; Gauthier B. R. 2012. Islet Beta-cell Mass Preservation and Regeneration in Diabetes Mellitus: Four Factors with Potential Therapeutic Interest. *Journal of Transplantation.* In press.
- Lukovic D.; Moreno-Manzano V.; Stojkovic M.; Bhattacharya S. S.; Erceg S. 2012.
Human pluripotent Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Stem Cells.* In press.

Protección de Resultados y Transferencia de Conocimiento

Durante este periodo se ha obtenido la siguiente patente:

Inventores (p. o. de firma): Franz Martín; Bernat Soria; M. A. Ortega.

Título: "Empleo de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca".

Número de solicitud: P201131979. País de Prioridad: España. Fecha de prioridad: 07-12-2011

Entidades Titulares: Fundación Progreso y Salud, Universidad Pablo de Olavide.

Seminarios Científicos

Junio de 2011-Junio de 2012

07.10.2011 Dr. Luciano Di Croce

"The impact of histone modifications and chromatin alterations on gene expression, stem cell differentiation and cancer"

Centre de Regulació Genómica (CRG) Barcelona

- 20.10.2011 Dr. Alberto R. Kornblihtt
"Chromatin and transcription regulate alternative splicing"
IFIBYNE-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina
- 28.10.2011 Dr. Romano Regáis
"Emerging roles of microRNAs in the control of pancreatic beta cell functions"
Université de Lausanne, Suiza
- 11.11.2011 Dr. José L. Gomez Skarmeta
"Interplay between pathways that maintain genome stability"
CABD, UPO-CSIC ,Sevilla.
- 21.11.2011 Dr. Andre Nussenzweig
"Nuclear and cytoplasmic regulation of gene expresión by the CPEB-family of RNA-binding proteins. From cell cycle to tumor development"
NIH/NCI, Bethesda, MD, USA
- 25.11.2011 Dr. Raúl Méndez
"Nuclear and cytoplasmic regulation of gene expression by the CPEB-family of RNA binding proteins. From cell cycle to tumor development "
Institute for Research in Biomedicina (IRB) Barcelona.
- 16.12.2011 Dr. Marisol Soengas
"Why do we not understand the impairment of oxidative phosphorylation system"
CNIO, Madrid
- 27.01.2012 Dr. Jan H. Hoeijmakers
"Transcription and its interface with other DNA-related processes"
Erasmus University, Rotterdam, NL

- 10.02.2012 Dr. Joan Seoane
"From oncogenic viruses to chromatin and cancer"
Vall D'Hebron Hospital, Barcelona.
- 09.03. 2012 Dr. Moshe Yaniv
"Nucleocytoplasmic transport in the midzone membrane domain controls mitotic spindle disassembly"
Institut Pasteur, Paris
- 16.03. 2012 Dr. Juan Jiménez
"Nucleocytoplasmic transport in the midzone membrane domain controls mitotic spindle disassembly"
CABD UPO-CSIC, Sevilla
- 23.03. 2012 Dr. Ginés Morata
"Cell competition and tumour development in Drosophila"
Centro de Biología Molecular (CBM). Madrid
- 20.04. 2012 Dr. M. Pía Cosma
"Dissecting mechanisms controlling somatic cell reprogramming and tissue regeneration"
Centre de Regulació Genòmica (CRG). Barcelona
- 25.05.2012 Dr. Isabel Fariñas
"Neural stem cells: life at home"
Departamento de Biología Celular. Universidad de Valencia