

Biología Molecular y Celular

Luis Enjuanes

Laboratorio Coronavirus

Mariano Esteban

Poxvirus y vacunas

Lluís Montoliu

Modelos animales por manipulación genética

José Ramón Naranjo

Análisis funcional el represor transcripcional
DREAM

Amelia Nieto

Mecanismos de interacción entre el virus de la
gripe y la célula infectada

Juan Ortín

Transcripción y Replicación del RNA del Virus
de la Gripe

Dolores Rodríguez Aguirre

Caracterización Molecular de Torovirus

Jose F. Rodríguez-Aguirre

Laboratorio Coronavirus

Carlos M^a Suñé Negre

Formación y Función de los mRNAs

**Antonio Alcamí (adscripción temporal
desde marzo 2004)**

Modulación de la Respuesta Immune por Virus

REPLICACIÓN, INTERACCIÓN VIRUS-HUÉSPED Y PROTECCIÓN EN CORONAVIRUS



Luis Enjuanes

Resumen

Los coronavirus tienen un genoma RNA de cadena sencilla y positiva con un tamaño de 30 kb, y son responsables de infecciones en las mucosas del tracto respiratorio y entérico. Los coronavirus tienen un alto impacto en salud humana y animal. Nuestro grupo está interesado en las bases moleculares de la replicación y transcripción, ensamblamiento e

interacción virus-huésped utilizando como modelos experimentales el coronavirus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) y el virus productor del síndrome respiratorio agudo y severo (SARS-CoV). La información derivada de estos estudios se está aplicando a la ingeniería de vectores basados en genomas de coronavirus.

La replicación y transcripción, así como las interacciones virus-huésped, están mediadas por uniones entre el RNA y proteínas virales y del huésped, y por interacciones proteína-proteína. Nosotros hemos postulado que la replicación y transcripción del genoma de coronavirus implica la interacción de los extremos 5' y 3' del genoma y estamos comprobando esta hipótesis e identificando las proteína virales y

celulares implicadas en este proceso. La transcripción de coronavirus requiere la síntesis discontinua de RNA, mediante la que el líder se une a las secuencias codificantes, en un proceso de selección de copia mediada por recombinación de RNA asistida por homología de secuencias. Basándonos en una colección de datos generados por genética reversa, nuestro laboratorio ha propuesto un mecanismo de transcripción. Hemos demostrado que la extensión del apareamiento entre la cadena naciente de RNA y secuencias del líder regulan la cantidad de RNA subgenómico. No obstante, existen mecanismos reguladores adicionales que modulan la cantidad de RNA subgenómico producido, tales como las interacciones RNA-proteína. Un objetivo importante de nuestro programa es el estudio del papel de

las chaperonas RNA en el cambio de molde durante la síntesis de RNA viral.

En la segunda área de trabajo del grupo, interacción virus-huésped, hemos postulado que proteínas específicas del virus, tales como la proteína N que se ha encontrado en el

núcleo de la célula, y proteínas virales no esenciales, modulan estas interacciones. Utilizando estrategias de genética reversa, basadas en la construcción de dos clones cDNA infectivos producidos en nuestro laboratorio para los virus TGEV y SARS-CoV, estamos estudiando

la influencia de los genes de coronavirus en la atenuación de estos virus, sobre el ciclo celular, o sobre funciones relevantes del huésped tales como la respuesta inmune. La información generada por proteómica y genómica funcional será esencial para estos estudios.

CORONAVIRUS TRANSCRIPTION

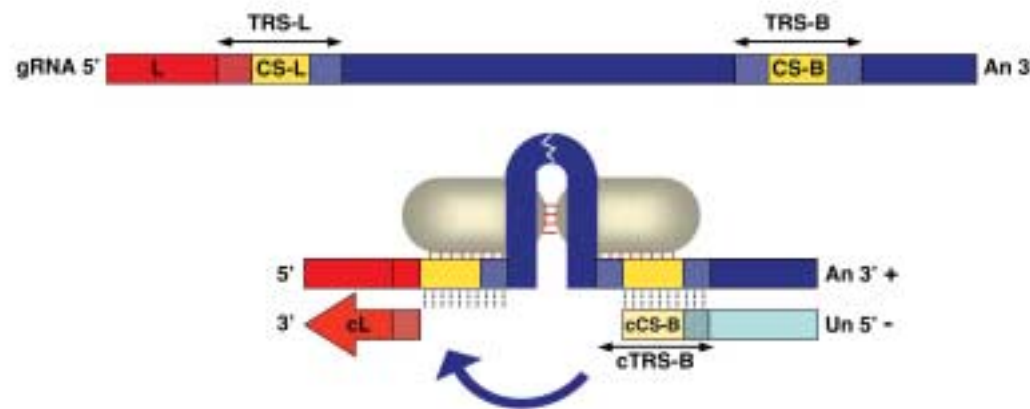


Figura 1. Diagrama de los elementos estructurales implicados en la transcripción de coronavirus. En la barra superior se indican las secuencias implicadas en la síntesis discontinua de la cadena de RNA negativa. CS-L y CS-B, secuencias conservadas del líder y de la zona codificante, respectivamente. TRS-L y TRS-B, secuencias reguladoras de la transcripción situadas a continuación del líder y precediendo a cada gen, respectivamente. An, Poli A. En la parte inferior de la figura se muestra un esquema de la transcripción en coronavirus, en el que se indica la producción discontinua de la cadena negativa. Los acrónimos CS-B y cTRS-B representan las secuencias complementarias CS-B y cTRS-B, respectivamente. Un, Poli U. Las secuencias del líder y las secuencias codificantes probablemente se encuentran próximas en el espacio debido a la formación de estructuras de orden superior que se mantienen por interacciones RNA-proteína y proteína-proteína.

PERSONAL



Jefe de Línea:

Luis Enjuanes

Becarios Postdoctorales:

Fernando Almazán

Isabel Sola

Javier Ortego

Sara Alonso

David Escors

Sonia Zúñiga

Becarios Predoctorales:

Carmen Galán

Carmen Capiscol

Jose L. Moreno

Marta L. DeDiego

Juan Ceriani

Aitor Nogales González

Técnicos de Investigación:

Carlos M. Sánchez

Diana Dorado

Margarita González

Visitantes:

Caroline Lassnig, Vienna, Austria.

Kersting Saenger, Riems, Germany.

Patricia Sabella, Fort-Dodge, Gerona, Spain.

Índice sección

Índice general

HOME

PUBLICACIONES

Ortego, J., Sola I., Almazan F., Ceriani J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana J. and Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential, but affects *in vivo* replication and virulence. *Virology*. **308**, 13-22.

Sola, I., Alonso, S., Zuñiga, S., Balach, M., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L. (2003). Engineering transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing latogenic immunity. *J. Virol.* **77**, 4357-4369.

Holmes, K.V. and Enjuanes, L. (2003). The SARS coronavirus: a postgenomic era. *Science* **300**, 1377-1378.

Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *J. Virol.* **77**, 7890-7902.

González, J.M., Gómez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E. and Enjuanes, L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* **148**, 2207-2235.

Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S. and Enjuanes, L. (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 980-994.

Bailey, M., Haweson, K., Jones, P., Miller, B., Sola, I., Enjuanes, L. and Stokes, C.R. (2004). Effect of infection with transmissible gastroenteritis virus on concomitant immune responses to dietary and injected antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **11**, 337-343.

Schwegmann-WeBels, C., Al-Falah, M., Escors, D., Wang, Z., Zimmer, G., Deng, H., Enjuanes, L., Naim, H.Y., Herrler, G. (2004). A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S protein of a porcine coronavirus but absent from SARS-associated coronavirus. *J. Biol. Chem.* **279**, 43661-43666.

Escors, D., Capiscol, C. and Enjuanes, E. (2004). Immunopurification applied to the study of virus protein composition and encapsidation. *J. Virol.* **119**, 57-64.

Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S. and Zuñiga, S. (2004). Coronavirus reverse genetics: viral based vectors for gene expression. *Curr. Top. Microbiol. & Immunol.* **287**, 161-197.

Almazan, F., Galan, C. and Enjuanes, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.

Enjuanes, L. (2004). Diseño y bioseguridad de vacunas y vectores virales. In: La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna. Doscientos Años de Lucha Contra la Viruela. Eds. Susana Ramírez, Luis Valenciano, Rafael Nájera, Luis Enjuanes. CSIC. Madrid, España, 347-381.

LIBROS / BOOKS

Enjuanes, L., Almazán, F and Ortego, J. (2003). Virus based vectors for gene expression in mammalian cells: coronavirus. In: "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Eds. S. C. Makrides. Elsevier Science. Amsterdam. Holanda.

Enjuanes, L. (2004). Coronavirus replication and reverse genetics. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag. Heidelberg, Germany.

Walker, P.J., Bonami, J. R., Boonsaeng, V., Chang, P.S., Cowley, J.A., Enjuanes. L., Flegel, T. W., Lightner, D. V., Loh, P. C., Snijder, E.J., Tang, K. (2004). Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Roniviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press. San Diego. USA.

Enjuanes, L. (2004). La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna. Doscientos Años de Lucha Contra la Viruela. Eds. S. Ramírez, L. Valenciano, R. Nájera, L. Enjuanes. CSIC. Madrid, Spain.

ARTICULOS DE DIVULGACIÓN / DIVULGATION ARTICLES

Escors, D., Enjuanes, L. (2003). Las enfermedades virales emergentes: el coronavirus del sindorme respiratorio agudo y severo. *Historia Natural*. Vol 1. PP. 48-52. October.

Enjuanes, L. (2004). Vacunacion y bioseguridad. "La Real Expedicion Filantropica de la Vacuna. Doscientos Años de Lucha Contra la Viruela". CSIC. Madrid. Spain. November.

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Enjuanes, L.

Immunotherapy of enteric infections by rotaviruses and coronaviruses using plantibodies.

Organismo financiador: UE, Proyecto: Ref. CE: QLK2-CT-2000-00739; CSIC: LIFE/992/0587, 2000 - 2003.

Enjuanes, L.(Coordinador del proyecto)

Biosafe coronavirus vaccine vector for the prevention of human infections of the enteric and respiratory tracts.

Organismo financiador: UE, Proyecto: Ref. CE: QLK2-CT-2001-00874; CSIC: LIFE/992/0859, 2001 – 2005.

Enjuanes, L.

Biosafe coronavirus vector-based vaccine for prevention of foot-and-mouth disease.

Organismo financiador: UE, Proyecto: Ref. UE: QLK2-CT-2002-00825, CSIC: LIFE/001/1282, 2002 – 2006.

Enjuanes, L.

Targeting immunostimulating complex production in plants.

Organismo financiador: UE., Proyecto: Ref. UE: QLK2-CT-2002-01050, CSIC: LIFE/001/1273, 2002 – 2005.

Enjuanes, L.

Ingeniería de genomas de coronavirus para el diseño de vectores bioseguros.

Organismo financiador: CICYT, Proyecto: Ref. BIO2001-1699, Duración: 2001 – 2004.

Enjuanes, L.(Coordinador del proyecto)

Development of intervention strategies against SARS in a European-Chinese taskforce.

Organismo financiador: UE, Proyecto: Ref. UE: SP22-CT-2004-511060, CSIC:SSP/STREP/02/0324, 2004 – 2007.

Enjuanes, L.

Replicación, interacción virus-huesped y protección en coronavirus.
Organismo financiador: CICYT, Proyecto: Ref. BIO2004-00636, 2004 – 2007.

Enjuanes, L.

Vectores virales y no virales en terapia génica. Aplicación de sistemas poliméricos inteligentes para la formación de complejos de baja toxicidad. Organismo financiador: CSIC, Proyecto: Ref. 200420F0294, 2004 – 2005.

Enjuanes, L.

Genomic inventory, forensis markers, and assessment of potential therapeutic and vaccine targert for viruses relevant in biological crime and terrorism.
Organismo financiador: UE, Proyecto: FP6-2004-SSP-4, 2004 – 2007.

Índice sección

Índice general

HOME

TESIS DOCTORALES

Cristina Riquelme Gabriel. (1998-2004).
Vectores basados en genoma del coronavirus TGEV.
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

Carmen Galán Avella. (2002-05).
Estudio de la replicación del coronavirus TGEV.
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

M. Carmen Capiscol Perez de Tudela. (2003-05).
Estudio de la señal de encapsidación del virus coronavirus TGEV.
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

Juan E. Ceriani. (2003-05).
Construcción de partículas análogas a rotavirus (VLP's) utilizando vectores virales basados en genomas de coronavirus.
Universidad Autonoma of Barcelona. Barcelona.

José Luis Moreno. (2004-05).
Estudio de la regulación de la transcripción de coronavirus. Diseño de un vector viral para vacunas y terapia génica.
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

Marta L. De Diego. (2004-05).
Interacción del coronavirus SARS con el huésped y protección frente a infecciones producidas por este virus
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

Aitor Nogales González. (2005).
Proteínas virales y celulares implicadas en la replicación del coronavirus TGEV.
Universidad Autonoma de Madrid. Madrid.

Scientific report
2003-2004
Memoria científica

CNIB
centro nacional de biotecnología

Biología molecular y celular

Índice sección

Índice general

HOME

LÍNEA DE
INVESTIGACIÓN

PERSONAL

PUBLICACIONES

PROYECTOS
CIENTÍFICOS

TESIS DOCTORALES

PATENTES



PATENTES

Enjuanes, L., Almazán Toral, F., González Martínez, J.M., Izeta, A., Péñzes, Z., Alonso Villanueva, S., Sánchez, C.M., Sola Gurpegui, I., Sánchez Morgado, J.M., Calvo Alcocer, E., Ortego Alonso, J., Escors, D., Barrado Guerrero, P., Riquelme Gabriel, C. y Plana Durán, J.
Nº Registro: CECT 5265(P 9902673).

POXVIRUS Y VACUNAS



Mariano Esteban

Resumen

Los objetivos fundamentales de nuestro laboratorio van dirigidos a comprender las bases moleculares en la patogenia de agentes infecciosos y su relación con el huésped, así como utilizar estos conocimientos para desarrollar vacunas que puedan ser efectivas en el control de enfermedades como Sida, Malaria y Leishmaniasis.

Como sistema modelo de agente infeccioso y como vector de expresión, utilizamos el virus vaccinia que pertenece a la familia de los poxvirus.

Las líneas de investigación son:

1. Mecanismo de ensamblaje del virus vaccinia;
2. Interacción virus-célula y acción de los interferones;
3. Desarrollo de vacunas contra sida, malaria y leishmania.

Queremos responder a las siguientes preguntas:

a) Cual es la estructura de las distintas formas del virus vaccinia (VV) y su contribución a la infección y distribución en tejidos.

b) Cual es la estructura del complejo viral A27L/A17L responsable de la unión del virus a la membrana celular.

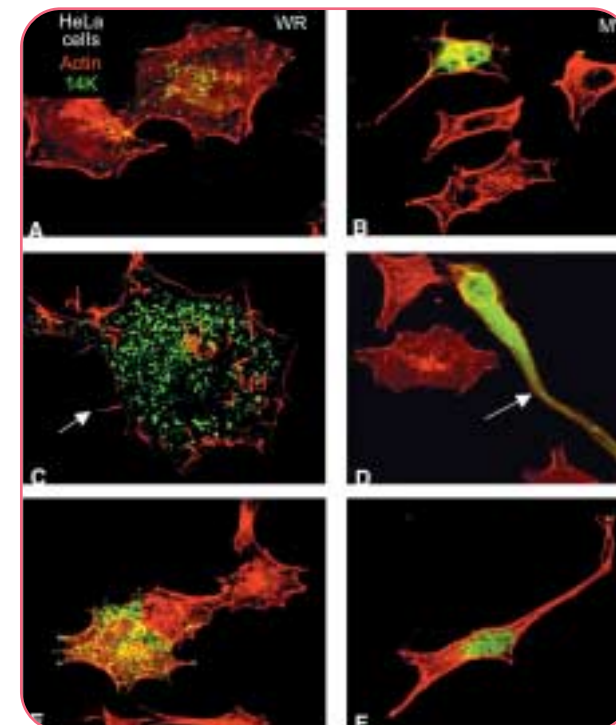


Figura 1. Expresión génica en células infectadas con MVA.

c) Cómo el VV inhibe la síntesis de proteínas celulares.

d) Cual es el impacto del VV y de sus formas mutantes sobre la expresión de genes celulares humanos y cómo estos genes facilitan/inhiben el proceso de replicación viral.

e) Cual es el papel de los genes inducidos por los interferones (IFN), como PKR y el sistema de la 2-5A sintetasa/RNasaL, en la actividad antiviral y antitumoral de los IFN; cómo los virus evaden el sistema del IFN y cómo se pueden utilizar estos genes para destruir células tumorales.

f) Cómo modular el sistema immune (humoral y celular) con poxvirus recombinantes y generar vacunas eficaces contra enfermedades humanas prevalentes (SIDA, malaria, leishmania, HCV, cancer).

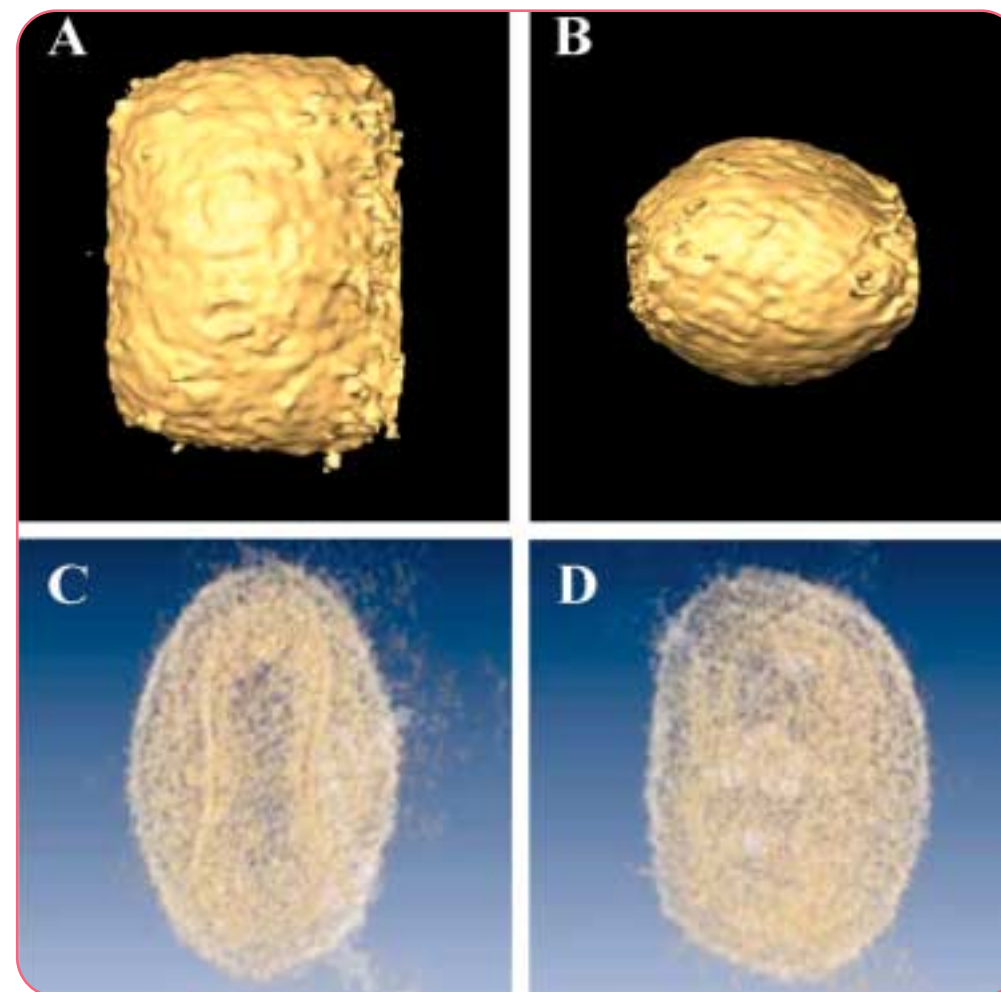


Figura 2. Estructura de la forma infectiva IMV del virus vaccinia (VV) a una resolución de 4-6 nm definida por crio-microscopía electrónica y tomografía.

PERSONAL



Jefe de Línea:

Mariano Esteban

Becarios Postdoctorales:

Alberto Fraile (Contract Ramón y Cajal)

Ivan Ventoso

Susana Guerra,

Carmen E. Gómez

Mariang García

Gracyna Kochan

Becarios Predoctorales:

Elena Domingo

José Luis Nájera

Eva Pérez

Magdalena Krupa

Andrea Vandermeeren

Técnicos de Investigación:

Victoria Jiménez

Yolanda García

PUBLICACIONES

Gherardi, M.M., Nájera, J.L., Pérez-Jiménez, E., Guerra, S., García-Sastre, A. and Esteban, M. (2003). Prime/boost immunization schedules based on influenza and vaccinia virus (VV) vectors (MVA and WR) potentiate cellular immune responses against HIV-env protein systemically and in the genito-rectal draining lymph nodes. *J. Virol.* **77**, 7048-7057.

Guerra, S., López-Fernández, L., Pascual-Montano, A., Muñoz, M., Harsman, K. and Esteban, M. (2003). Cellular gene expression survey upon vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol.* **77**, 6493-6506. (front cover Dec. issue).

Gallego-Gómez, J.C., Risco, C., Rodríguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J.L. and Esteban, M. (2003). Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between the MVA and other strains (WR, Ankara, NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol.* **77**, 10606-10622.

Gil, J., García, M.A., Gómez-Puertas, P., Guerra, S., Rullás, J., Alcamí, J. and Esteban, M. (2004). TRAF family proteins link PKR with NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4502-4512.

Gherardi, M.M., Pérez-Jimenez, E., Nájera, J.L. and Esteban, M. (2004). Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol.* **172(10)**, 6209-20.

Tapia, E., Pérez-Jimenez, E., Lopez-Fuertes, L., Gonzalo, R. and Esteban, M (2003). The combination of vectors expressing IL-12+IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes and Infection* **5**, 73-84.

Ramirez, J.C., Finke, D., Esteban, M., Kraehenbuhl, J.P. and Acha-Orbea, H (2003). Tissue distribution of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) after mucosal or systemic administration. *Arch. Virol.* **148**, 827-839.

Gherardi, M.M., Nájera, J.L., Pérez-Jiménez, E., Guerra, S., García-Sastre, A. and Esteban, M. (2003). Prime/boost immunization schedules based on influenza and vaccinia virus (VV) vectors (MVA and WR) potentiate cellular immune responses against HIV-env protein systemically and in the genito-rectal draining lymph nodes. *J. Virol* **77**, 7048-7057.

Ramiro, M.J., Zárate, J.J., Hanke, T., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J.A. and Larraga, V (2003). Protection against *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis in dogs is achieved by immunization with heterologous prime-booster regime using LACK-expressing DNA and recombinant vaccinia virus. *Vaccine* **21**, 2471-2484.

Guerra, S., López-Fernandez, L., Pascual-Montano, A., Muñoz, M., Harsman, K. and Esteban, M (2003). Cellular gene expression survey upon vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol* **77**, 6493-6506. (front cover Dec issue).

Esteban, M., García, M.A., Domingo-Gil, E., Arroyo, J., Nombela, C. and Rivas, C. (2003). The latency protein LANA 2 from Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) inhibits apoptosis induced by PKR but not RNase L activation. *J. Gen. Virol* **84**, 1463-1470.

Gherardi, M.M., Ramirez, J.C. and Esteban, M (2003). Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergize to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J. Gen. Virol.* **84**, 1961-1972.

González-Lopez, C., Martinez-Costas, J., Esteban, M. and Benavente, J (2003). Avian reovirus sA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Gen. Virol.* **84**, 1629-1639.

Gallego-Gómez, J.C., Risco, C., Rodríguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J.L. and Esteban, M (2003). Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between the MVA and other strains (WR, Ankara, NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol* **77**, 10606-10622.

González-Aseguinolaza, G., Nakaya, Y., Molano, A., Dy, E., Esteban, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Palese, P., García-Sastre, A. and Nussenzweig, R.S (2003). Induction of protective immunity against malaria by prime/boost immunization with recombinant cold- adapted influenza and modified vaccinia virus Ankara viruses expressing a CD8+ T cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J. Virol* **77** , 11859-11866.

Gómez, C.E., Abaitua, F., Rodríguez, D., Duarte, C. and Esteban, M (2003). Efficient CD8+ T cell response to HIV-env V3

loop epitope from multiple isolates by a DNA prime/vaccinia virus boost (rWR and rMVA strains) immunisation regime and enhancement by the cytokine IFN- γ . *Virus Research* 105, 11-22

Diderlaurent, A., Ramirez, J.C., Graff, M., Gherardi, M., Orbea, H-A., Wagner, H., Esteban, M., Kraehenbuhl, J-P, and Sirard, J-C (2004). Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2 restricted cytotoxic T cell responses. *Vaccine* **22**, 3395-3403.

Gil, J., García, M-A., Gómez-Puertas, P., Guerra, S., Rullás, J., Alcamí, J. and Esteban, M (2004). TRAF family proteins link PKR with NF-kB activation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4502-4512.

Guerra, S., Lopez-Fernandez, L.A., Conde, R., Pascual-Montano, A., Harshman, K. and Esteban, M. (2004). Microarray Analysis Reveals Characteristic Changes of Host Cell Gene Expression in Response to Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Infection of Human HeLa Cells. *J Virol* **78(11)**: 5820-34.

Gherardi, M. M., Pérez-Jimenez, E., Nájera, J.L and Esteban, M. (2004). Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule." *J Immunol* **172(10)**: 6209-20.

Esteban, M. (2004). Conceptos y futuras aplicaciones de la genómica, proteómica y bioinformática en el campo de la salud. En Genoma España, *Salud Humana*, pp 99-104

Esteban, M. (2004). Desarrollo de nuevas vacunas basadas en poxvirus. En "Real Expedición Filantrópica de la Vacuna. Doscientos años de lucha contra viruela". Biblioteca de Historia de América, CSIC. p 333-345.

Gil, J. and Esteban, M. (2004). Vaccinia virus recombinants as a model system to analyze interferon-induced pathways. *J. Interferon and Cytokine Research* **24**, 637-646

Índice sección

Índice general

HOME

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Mariano Esteban. Principal Spanish Investigator.
Effector and memory anti-malaria CD8+ cell responses.
National Institutes of Health (NIH), 1 R01 AI44375-01, 1999-2003, US \$165.000.

Mariano Esteban. Principal Spanish Investigator.
Visceral Leishmaniasis vaccine: murine model studies.
National Institute of Health (NIH), USA. R01 AI45044. 2000-2003.US \$ 50.000

Project Leader of the EuroVac Cluster, European Vaccine Effort Against HIV/AIDS, Fifth Framework Programme, QLRT-PL1999-01321, Euros 329.065, 1999-2004.

Concerted Action, Fifth Framework Programme, European Vaccine against Aids (EVA) CFAR, QLRT-PL1999-00609, 2000-2003.

Mariano Esteban. Principal Investigator.
Contract wih GALENICA , USA, 2003-2004.

Mariano Esteban. Principal Investigator.
Premio IBERDROLA Ciencia y Tecnología, Profesores Visitantes, 2000-2003.

Mariano Esteban. Principal Investigator.
Desarrollo de nuevas herramientas moleculares para el estudio del virus de la hepatitis C y su aplicación a morfogénesis, estructura, resistencia del virus a interferon y caracterización de la respuesta inmune al virus.
BIO2000-0340-P4, 2001-2003. 171.649 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Diseño y utilización del virus vaccinia como vacuna contra distintas enfermedades: análisis de la interacción virus-célula y modulación de la respuesta inmune.

BIO2001-2269, 2001-2003, 170.000 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Desarrollo de nuevas herramientas moleculares para el estudio del virus de la hepatitis C y su aplicación a morfogénesis, estructura, resistencia del virus a interferon y caracterización de la respuesta inmune al virus.

BIO2000-0340-P4. 2000-2003, 171.649 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Mecanismo de acción de los interferones: análisis estructural y funcional de la proteína quinasa PKR, un activador de apoptosis e inhibidor viral.

BMC2002-03246, 2002-2005, 196.650 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Analysis of the molecular mechanism of hepatitis C virus (HCV) resistance to antiviral therapy.

EU QLK2-CT-2002-00954. 2002-2005, 124.313 Euros.

Mariano Esteban. Coordinator.

Increasing the potency of vaccinia MVA vaccines.

EU QLK2-CT-2002-01867. 2002-2005. 220.000 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Potenciación de la respuesta inmune (sistémica y de mucosas frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).

FIPSE, 2002-2005, 209.365 Euros.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Vaccine strategies for combined targeting of innate and adaptive immune pathways (VaccTIP).

EU-2004-012161. 177.000 euros. 2004-2006.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Diseño de nuevas vacunas tanto preventivas como terapéuticas para las enfermedades de mayor prevalencia: sida, hepatitis C y cáncer de próstata.

BIO2004-03954,180.000 euros. 2004-2007.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Desarrollo de vacunas contra enfermedades prevalentes.

Fundación Botín, 200.000 euros/year. 2005-2010.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Desarrollo de una vacuna contra Leishmaniasis.

Comunidad de Madrid. 41000 euros. 2005.

Mariano Esteban. Principal Investigator.

Contract with GRIFOLS. 2005-2006.

Índice sección

Índice general

HOME



TESIS DOCTORALES

Juan Carlos Gallego Gómez (2003).

Biología celular de la infección y morfogénesis de mutantes atenuados del virus vaccinia.
Universidad Autónoma de Madrid. Sobresaliente *cum laude*.

Carmen E. Gómez (2003).

Respuesta inmune generada por sistemas combinados de vacunación frente a péptidos de la envuelta del VIH-1 incluidos en la proteína multiepitópica TAB-13.
Universidad Autónoma de Madrid. Sobresaliente *cum laude*.

María Angel García Chaves (2004).

Mecanismo de acción y regulación de la proteína quinasa inducida por interferon, PKR.
Universidad Autónoma de Madrid. 30 Abril de 2004. Sobresaliente *cum laude*. Premio Extraordinario UAM.

Índice sección

Índice general

HOME

CONTRATOS

Empresas:

Análisis de anticuerpos contra el virus vaccinia en preparados de inmunoglobulinas humanas (IGIVs).
GRIFOLS, S.A , 2004-2006.

Fundaciones:

Principal investigator.

Potenciación de la respuesta inmune (sistémica y de mucosas) frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).
FIPSE, 2002-2006.

Principal Investigator.

Desarrollo de vacunas contra enfermedades prevalentes.
Fundación Botín, 2005-2010.

Índice sección

Índice general

HOME



PATENTES

Pérez-Jiménez, E. y Esteban, M.

VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS CONTRA LEISHMANIASIS.

Solicitud de invención N° 200501886.

Gómez, C.E., Nájera, J.L., Jiménez, V. y Esteban, M.

VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS PREVENTIVAS Y TERAPEUTICAS CONTRA EL SIDA.

Solicitud de invención N° 200501841.

Índice sección

Índice general

HOME

MODELOS ANIMALES POR MANIPULACIÓN GENÉTICA



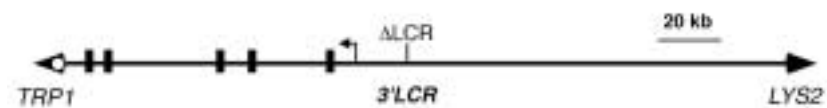
Lluís Montoliu

Resumen

Estamos interesados en entender el funcionamiento y la organización de los dominios de expresión de en el genoma de mamíferos. Nos gustaría conocer los elementos reguladores necesarios que identifican un dominio de expresión determinado y especifican su patrón de expresión en espacio, en tiempo y cantidad, con objeto de mejorar el diseño de estra-

tegias de transferencia génica, usadas en transgénesis animal y en terapia génica. Usamos dos modelos experimentales: el gen de la tirosinasa y el gen de la proteína ácida del suero de la leche de ratón, dos locus independientes, regulados a nivel de desarrollo y específicos de tejido, que nos han servido para identificar elementos reguladores fundamentales, como por ejemplo aisladores genómicos y regiones controladoras de locus (LCR). Desarrollamos nuestros experimentos in vivo, mediante el uso de animales transgénicos, con grandes construcciones basadas en cromosomas artificiales que modificamos mediante recombinación homóloga, con objeto de investigar el papel funcional de secuencias específicas. También in vitro, mediante el uso de células y análisis cromatínicos de

interacción DNA-proteína. Adicionalmente, nuestro laboratorio ha generado y analizado nuevos modelos animales para el estudio de las anomalías en el desarrollo de la retina asociadas al albinismo, y de los genes implicados en el proceso. Finalmente, a través de colaboraciones, hemos desarrollado varios modelos animales adicionales (transgénicos y mutantes) para el estudio de enfermedades o procesos asociados al SNC (Alzheimer, dolor, psicosis).



· · · · · Figura 1. Ratón albino y transgénico (delante)
· · · · · generado por ICSI con un YAC que contiene el gen
· · · · · de la tirosinasa en el que se ha eliminado la región
· · · · · controladora de locus (LCR) mediante recombinación
· · · · · homóloga en levaduras. Se aprecia una disminu-
· · · · · ción importante de la expresión de tirosinasa en
· · · · · la piel pero no en el ojo (ver Moreira et al. 2004).

PERSONAL



Fotografía del Laboratorio (Diciembre 2004) De izquierda a derecha: Lluís Montoliu, Alfonso Lavado, Victoria Tovar, Lucía Regales, Julio Pozueta, Rosa Roy (delante), Soledad Montalbán, Marta Cantero, Ángel García, Patricia Cozar.

Jefe de Línea:

Dr. Lluís Montoliu José

Investigadores Postdoctorales :

Dr. Alfonso Lavado Júdez
(desde / from 01-04-2004)

Dra. Patricia Giraldo Carbajo
(hasta / up to 30-03-2003)

Dra. Victoria Tovar Herrador

Dra. Rosa Roy Barcelona

(desde / from 01-11-2003)

Dr. Francisco Javier Rodríguez Jiménez
(desde / from 01-10-2003 hasta / up to
28-02-2004)

Becarios Predoctorales:

Alfonso Lavado Júdez
(hasta / up to 31-03-2004)

Lucía Regales Álvarez

Ángel García Díaz

Julio Pozueta Larios

Julia Fernández Punzano (Titulado Superior,
desde / from 01-11-2004)

Estudiantes Predoctorales Visitantes:

Rodolfo Moreno (desde / from 01-02-2003
hasta / up to 30-04-2003)

Estudiantes de licenciatura visitantes:

Elisa Jiménez (hasta / up to 30-06-2003)

Técnicos de investigación:

Patricia Cozar López

Marta Cantero González

Servicio de Histología del CNB:

Noemí Magán (desde / from 01-03-2004
hasta / up to 30-11-2004)

Soledad Montalbán Iglesias

(desde / from 01-12-2004)

Científicos Visitantes:

Dra. Karoline Lassnig (IFA Tulln, Department
of Animal Production, Tulln, Austria) (March
2003)

Dra. M^a Carmen Muñoz (Trasngenic Unit,
Parc Científic de Barcelona, PCB) (July-
August 2004)

Dr. Glen Jeffery (University College London,
Institute of Ophthalmology, London, UK)
(January and December 2004)

PUBLICACIONES

INTERNATIONAL SCIENTIFIC JOURNALS

Moreira, P.N., Giraldo, P., Cozar, P., Pozueta, J., Jiménez, A., Montoliu, L.* and Gutiérrez-Adan A*. (2004). Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* Dec; **71(6)**:1943-7.

Montoliu, L. (2004). 5th Transgenic Technology meeting (<http://www.imbim.uu.se/transtech>) Transgenic Research 13:605-6. [meeting report]

Giménez, E., Lavado, A., Giraldo, P., Cozar, P., Jeffery, G., Montoliu, L. (2004). A transgenic mouse model with inducible Tyrosinase gene expression using the tetracycline (Tet-on) system allows regulated rescue of abnormal chiasmatic projections found in albinism. *Pigment Cell Research* Aug; **17(4)**:363-70.

Montoliu, L., Larue, L. and Beermann, F. (2004). On the use of regulatory regions from pigmentary genes to drive the expression of transgenes in mice. *Pigment Cell Research* Apr; **17(2)**:188-90.

Regales, L., Giraldo, P., García-Díaz, A., Lavado, A. and Montoliu, L. (2003). Identification and functional validation of a 5' upstream regulatory sequence in the human tyrosinase gene homologous to the locus control region of the mouse tyrosinase gene. *Pigment Cell Research* Dec; **16(6)**:685-92.

Giraldo, P., Rival-Gervier, S., Houdebine, L.M. and Montoliu, L. (2003). The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Research* Dec; **12(6)**:751-5.

Giménez, E., Lavado, A., Giraldo, P. and Montoliu, L. (2003). Tyrosinase gene expression is not detected in mouse brain outside the retinal pigment epithelium cells. *European Journal of Neurosciences* Nov; **18(9)**:2673-6.

Montoliu, L. (2003). Manipulating the mouse embryo: easier than ever! *Transgenic Research* **12**:635-6. [book review].

Giraldo, P., Martínez, A., Regales, L., Lavado, A., García-Díaz, A., Alonso, A., Busturia, A. and Montoliu, L. (2003). Functional dissection of the mouse tyrosinase locus control region identifies a new putative boundary activity. *Nucleic Acids Research* Nov **1;31(21)**:6290-305.

Langa, F., Codony, X., Tovar, V., Lavado, A., Giménez, E., Cozar, P., Cantero, M., Dordal, A., Hernández, E, Pérez R, Monroy, X., Zamanillo, D., Guitart, X. and Montoliu, L. (2003). Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. *European Journal of Neurosciences* **18(8)**:2188-96.

Millot, B., Montoliu, L., Fontaine, M.L., Mata, T. and Devinoy, E. (2003). Hormone-induced modifications of the chromatin structure surrounding upstream regulatory regions conserved between the mouse and rabbit whey acidic protein genes. *Biochemical Journal* **15;372(Pt 1)**:41-52.

Montoliu, L. (2003). Simple databases to monitor the generation and organisation of transgenic mouse colonies. *Transgenic Research* **12(2)**:251-3.

INTERNATIONAL BOOKS AND BOOK CHAPTERS

Montoliu, L. (2003). Large-scale preparation of agarose plugs of yeast DNA (pp. 326-328); Purification of YAC DNA with filtration units (pp- 329-331). Preparing injection buffer for BAC/YAC DNA (pp. 333). In: *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual (Third Edition)*. Andras Nagy, Marian Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Millot, B., Montoliu, L., Petitbarat, M., Mata, T., Fontaine, M.L. and Devinoy, E. (2003). Regulation of milk protein gene expression. In: *Milk & Research (38º Simposio Internazionale di Zootecnia)* G.F. Greppi & G. Enne (eds.). MG Print on Demad. Lodi, pp. 3-13.

NATIONAL BOOKS AND BOOK CHAPTERS

Montoliu, L. (2004). Clonación en mamíferos: aspectos científicos e implicaciones terapéuticas. En: Últimas investigaciones en biología: células madre y células embrionarias. José Fernández Piqueras (Ed.), Publicaciones de la Universidad Internacional Menéndez y Pelayo (UIMP), Ministerio de Educación y Ciencia. (pp. 55-88).

Montoliu, L. (2003). Traslado de genes (animales transgénicos, mutantes y clónicos). En: 50 años de ADN. Pedro García Barreno (Ed.), Editorial Espasa-Forum, capítulo 6, (pag. 183-227), Madrid.

Montoliu, L. (2003). Células troncales: aspectos científicos. En: Células troncales humanas: aspectos científicos, éticos y jurídicos. Juan Ramón Lacadena (Ed.), Colección Dilemas Éticos de la medicina actual-17, Vol. 49 (pag. 23-62). Publicaciones de la Universidad Pontificia Comillas/Editorial Desclée de Brouwer, S.A.

Índice sección

Índice general

HOME

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Montoliu, Lluís

Functional and structural characterisation of genomic boundaries
Spanish Ministry of Science and Technology, National Plan R+D+i, Biotechnology Program, BIO2003-08196, 2004-2006.

Montoliu, Lluís (sub-project, Coordinator: Dr. Mara Dierssen, CRG, Barcelona)

Murine models of central nervous system (CNS) disease.
Autonomous Government of Catalunya, Generalitat de Catalunya, Thematic Network, 2003-2005, 2001-2003.

Montoliu, Lluís

Identification of genes associated with retinal development: analysis of visual deficits associated with hypopigmentary diseases (albinism).
Autonomous Government of Madrid, CAM, 08.5/0046.1/2003, 2003-2004.

Montoliu, Lluís (Austrian partner: Prof. Mathias Müller, Veterinary University of Vienna)

Artificial chromosomes in mammary gland transgenesis.
Joint Collaborative Project, Spain-Austria, HU2001-0025, 2002-2003.

Montoliu, Lluís

Genomic boundaries in gene transfer events.
Spanish Ministry of Science and Technology, National Plan R+D+i, Biotechnology Program, BIO2000-1653, 2001-2003.

TESIS DOCTORALES

Mata González, Teresa

Functional and structural characterisation of new mammary gland-specific expression vectors based in the mouse whey acidic protein gene.

Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional, México DF (2004). Mark: Apto
Supervisors: Dr. Vianney Ortiz-Navarrete (CINVESTAV, México, DF) and Dr. Lluís Montoliu.

Lavado Júdez, Alfonso Javier

Animal models for the functional study of the mouse tyrosinase gene and the consequences associated with its mutation in the mammalian visual system.

Autonomous University of Madrid (2004). Mark: Excellent cum laude.

Supervisor: Dr. Lluís Montoliu

Índice sección

Índice general

HOME

CONTRATOS

Lluís Montoliu

Formation in techniques for the generation and the analysis of trasngenic and knockout mice.
Fundación Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona Science Park Foundation (Barcelona), June-August 2004.

Lluís Montoliu

Generation of chimeras to obtain knockout mice for the LAT2 gene.
Fundación Institut de Recerca Oncològica (IRO), Institute of Oncology Research Foundation (Barcelona).
June-August 2004.

Lluís Montoliu

Production, rederivation and cryopreservation of knockout mice for the Sigma-I receptor gene.
Laboratorios del Dr. Esteve, S.A. (Barcelona).
July 2003- June 2006.

Lluís Montoliu

Analysis of genetic polymorphisms (microsatellite variants) in mice.
Bionostra, S. L. (Madrid).
May-July 2003.

Lluís Montoliu

Analysis of the phenotype of knockout mice for the Sigma-I receptor gene.
Laboratorios del Dr. Esteve, S.A. (Barcelona).
September 2001-August 2004.



PATENTES

Moreira, P.N, Gutiérrez-Adán, A. and Montoliu, L.I.

A method for the stable introduction of large DNA sequences in the genome of non-human mammals
INIA and CSIC

Spain (OEP: P 200400857) 6 April 2004

Índice sección

Índice general

HOME

ANÁLISIS FUNCIONAL EL REPRESOR TRANSCRIPCIONAL DREAM



Jose Ramón Naranjo

Resumen

La línea de investigación de mi laboratorio durante los últimos años ha ido enfocada a comprender los mecanismos de regulación de la expresión génica en neuronas, en respuesta a señales externas que inducen depolarización de la membrana plasmática. Desde el estudio de la respuesta temprana, en los últimos años

nos centramos en el estudio de la señal del calcio y la señalización por estos iones en citosol y/o en núcleo para controlar redes transcripcionales de expresión en poblaciones neuronales concretas frente a estímulos específicos tanto fisiológicos como patológicos.

Nuestros objetivos incluyen i) el conocimiento de estos mecanismos moleculares tanto en sistemas experimentales sencillos como su análisis in vivo mediante modelos animales modificados genéticamente o protocolos usando ARNs de interferencia en animal entero y ii) la caracterización fenotípica de modelos animales de patologías humanas con valor potencial para el rastreo farmacológico o su aplicación en estrategias de terapia génica.

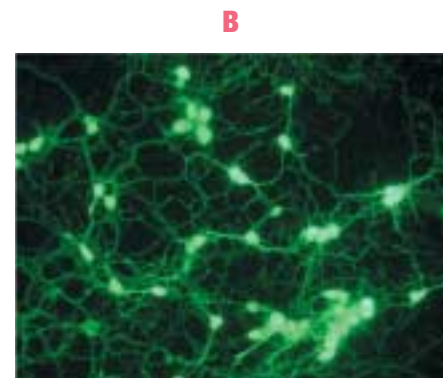
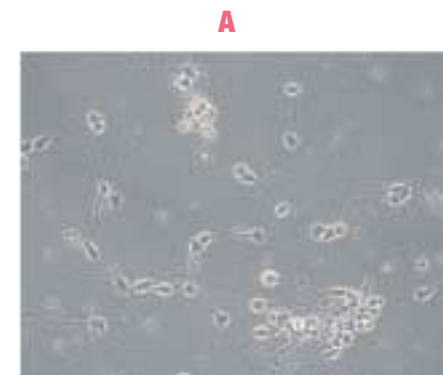


Figura 1. Cultivo de neuronas corticales de ratón expresando la proteína GFP 48 horas después de la infección con un vector lentiviral codificando para GFP.
A) imagen de contraste de fases.
B) Imagen de fluorescencia mostrando el marcaje GFP.

PERSONAL



Jefe de Línea:

José Ramón Naranjo

Personal científico:

Britt Mellström (Ramón y Cajal Prog.)

Marta Nieto (Ramón y Cajal Prog.)

Becarios Postdoctorales:

Dr. Magali Savignac

Marie Curie CEE Prog.

Dr. Malgorzata Palczewska

FEBSS Fellow

Dr. Marcos Rivas

CAM Prog

Dr. Rosa Gómez

J. de la Cierva Prog.

Becarios Predoctorales:

J. Rubén Cabrera

MEC (3rd year)

Jorge Barrio

MEC (3rd year)

Técnicos de Investigación:

David Campos

M. Paz González

PUBLICACIONES

Zamorano, A., Lamas, M., Vergara, P., Naranjo, J.R. and Segovia, J. (2003). Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J. Neurosci. Res.* **71**: 256-63.

Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzman, L., Romo, X., De Los Angeles García, M., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Hinrichs, M.V. and Olate, J. (2003). Human brain synembryon interacts with Galpha and Gqalpha and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J Cell Physiol.* **195**: 151-157.

Link, A. W., Ledo, F., Torres, B., Palczewska, M., Madsen, T.M., Savignac, M., Albar, J.P., Mellström, B. and Naranjo, J.R. (2004). Day-Night changes in DREAM activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J. Neurosci.* **24**: 5346-5355.

Rivas, M., Mellström, B., Naranjo, J.R. and Santisteban, P. (2004). Transcriptional repressor DREAM interacts with TTF-1 and Pax-8 and down regulates thyroglobulin gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**: 33114-33122.

Zamorano, A., Mellstrom, B., Vergara, P., Naranjo, J.R. and Segovia, J. (2004). Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo*. *Neurobiol. Dis.* **15**: 483-91.

Mellstrom, B., Torres, B., Link, W.A. and Naranjo, J.R. (2004). The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca²⁺-dependent gene expression. *Crit Rev Neurobiol* **16(1-2)**: 43-50.

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Proyecto 08.5/0045.1/2003 (CAM) Análisis de la regulación de BDNF por mutantes DREAM en cerebro de ratones transgénicos 1/10/2003 - 30/9/2004. 32.619 .

Proyecto GR/SAL/0888/2004 (CAM) Análisis de la funcionalidad de DREAM en la glandula tiroidea. 1/1/2005 - 31/12/2005. 43.960.

Proyecto BMC2001-1431 (CICYT) Análisis de las interacciones proteina-proteina y los genes diana que median los efectos transcripcionales de DREAM. 28/12/2001- 27/12/2004. 207.349.

Proyecto SAF2004-06644 (CICYT) Análisis genómico y fenotípico de modelos transgénicos por sobreexpresión de mutantes del represor DREAM en cerebro. 13/12/2004- 12/12/2007. 293.700.

Proyecto GEN2003-20651-C06-01 (CICYT) Análisis genómico y proteómico de la adicción a psicoestimulantes: papel del represor DREAM. 1/9/2004- 31/8/2007. 253.000.

Project RGP0156/2001-B. (HFSP) Calcium-regulated expression of calcium transporting systems during neuronal development, survival and death (Grant coordinator). June 2001 to May 2004. 187.500 \$.

Project LSHM-CT-2004-512039 (VI Framework Program) NoE "Neurone" Molecular mechanisms of neuronal degeneration: from cell biology to the clinic 13/12/2004 - 12/12/2008. 136.850.

Índice sección

Índice general

HOME

MECANISMOS DE INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS DE LA GRIPE Y LA CÉLULA INFECTADA



Amelia Nieto

Resumen

Según progresamos en el estudio de las diferentes funciones de las proteínas virales y de los mecanismos que los virus utilizan para expresar su genoma, se hace más evidente la contribución de la célula huésped. Existen muchos ejemplos de virus que utilizan proteínas celulares o RNAs como cofactores para su propia transcripción y/o replicación y muchos

virus RNA parasitan la maquinaria de expresión celular, lo que termina en una síntesis preferencial de proteínas virales concomitantemente con una inhibición de las celulares.

El virus de la gripe posee un genoma segmentado de ocho cadenas de RNA de polaridad negativa y su polimerasa está compuesta por tres subunidades denominadas PB1, PB2 y PA. Durante varios años hemos estado involucrados en i) la caracterización de la función individual de la subunidad PA de la polimerasa y ii) la caracterización de la función de la proteína no estructural NS1 en la activación traduccional específica de los mRNAs virales. A lo largo de estos estudios hemos buscado factores celulares que pudieran estar involucrados en estas funciones virales. Estos estudios

nos forzaron a estudiar tanto las funciones celulares de estas proteínas cómo su relevancia para el ciclo del virus. Como ejemplo del trabajo realizado se caracterizó la función de modulador transcripcional de la RNA polimerasa II de una proteína que interacciona con la subunidad PA de la polimerasa del virus de la gripe necesaria para la expresión viral. Estos datos sugieren que la polimerasa viral y la celular podrían requerir factores comunes para una correcta expresión del genoma. Por otro lado se encontró que la asociación del factor de iniciación de la traducción eIF4GI a NS1, junto con su asociación a la proteína de unión a poly A está involucrada en el mecanismo por el cuál NS1 realiza la activación traduccional selectiva de los mRNAs virales. Por todo ello además de los aspectos mencionados nos

enfrentamos a una pregunta biológica: El virus de la gripe y la célula infectada: por que proteínas compiten y que proteínas comparten?.

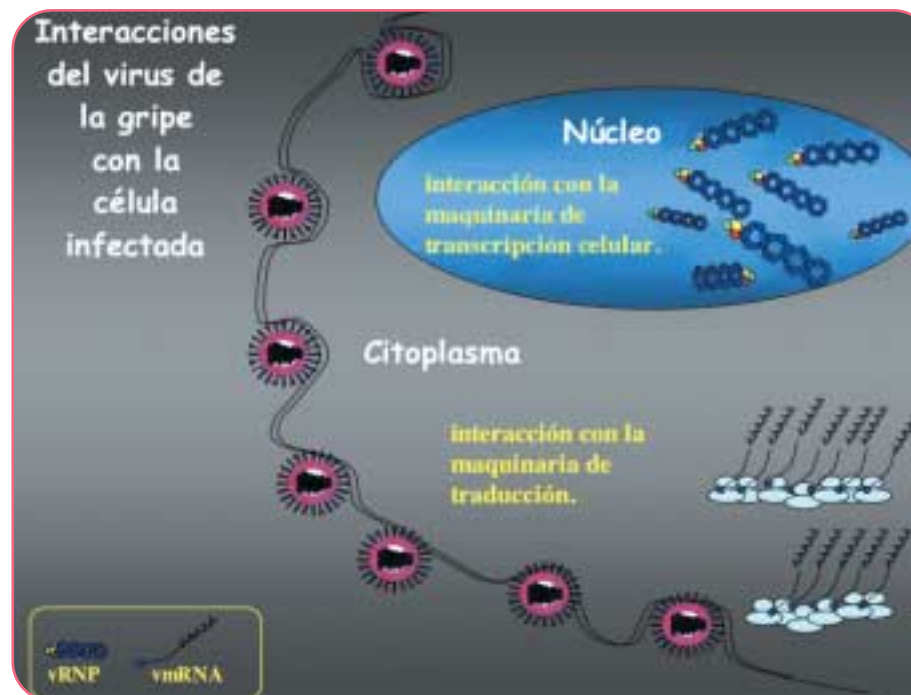


Figura 1. Se representa la entrada del virus de la gripe en una célula infectada, así como la presencia del genoma viral en el núcleo celular, donde se realizan todos los procesos de transcripción y replicación virales. En amarillo se representa las interacciones del virus con la célula infectada que están relacionadas con la transcripción y la traducción celulares.

PERSONAL



Jefe de Línea:
Amelia Nieto

Becarios Postdoctorales:
Thomas Lutz

Becarios Predoctorales:
Idoia Burgui
Alicia Pérez
Ariel Rodríguez
Emilio Yangüez

PUBLICACIONES

Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., Ortin, J., García-Sastre, A. and Nieto, A. (2003). Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol.* **77**, 6007-6013.

Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. and Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**, 3263-3274.

Falcón, A., Marión, R.M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A. and Ortín, J. (2004). Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* **78**, 3880-3888.

Índice sección

Índice general

HOME

TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN DEL RNA DEL VIRUS DE LA GRIPE



Juan Ortín

Resumen

Los virus de la gripe tienen gran incidencia en la salud humana, ya que disponen de un amplio reservorio animal y reaparecen continuamente en la población humana. Son muy variables genéticamente y dan origen a infecciones respiratorias en el hombre. Estos virus contienen un genoma de RNA segmentado y polaridad negativa. Cada una de estas

moléculas de RNA replican independientemente en forma de ribonucleoproteínas (RNPs), en el núcleo de las células infectadas. Nuestro objetivo a largo plazo es determinar las estructuras del complejo de la RNA polimerasa viral y de la RNP para entender los mecanismos por los que esta máquina molecular transcribe y replica el genoma viral. En este sentido, será muy importante determinar las interacciones entre la RNP y los factores celulares involucrados en estos procesos, así como en el control posttranscripcional de la expresión génica. Nuestro grupo está abordando estos objetivos mediante una combinación de estrategias experimentales de Biología Estructural, Bioquímica y Biología Celular.

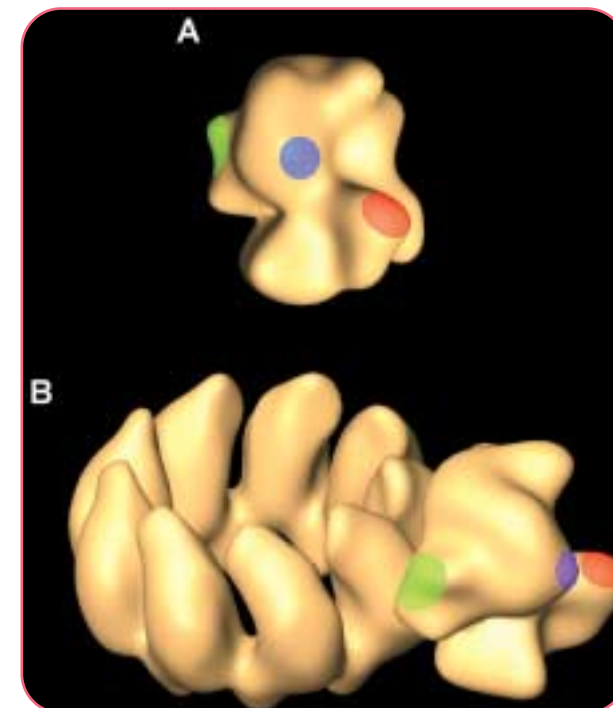


Figura 1. Estructura tridimensional de la polimerasa del virus de la gripe (A) y de una mini-ribonucleoproteína recombinante con 9 monómeros de nucleoproteína (B). Las zonas coloreadas indican la localización aproximada de las subunidades de la polimerasa: Rojo-PB2; Violeta-PA; Verde-PB1.

PERSONAL



Jefe de Línea:
Juan Ortín

Becarios Postdoctoral:
Íñigo Salanueva
Sandra Ufano

Becarios Predoctorales:
Estela Area
Rocío Coloma
Ana M. Falcón
Urtzi Garaigorta
Pablo Gastaminza
Nuria Jorba
Eva Torreira
Patricia Villacé

Ayudantes:
Yolanda Fernández

PUBLICACIONES

Gastaminza, P., Perales, B., Falcón, A.M. and Ortín, J. (2003). Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J. of Virol.* **77**, 5098-5108

Ortin, J. (2003). Unraveling the replication machine from negative-stranded RNA viruses. *Structure* **11**, 1194-1196

Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortín, J. (2004). Three dimensional structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 308-313.

Falcón, A.M., Marión, R.M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A. and Ortín, J. (2004). Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J. Virol.* **78**, 3880-3888.

Villacé, P., Marión, R.M. and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2411-2420.

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Red Europea "European Vigilance Network for the Management of Antiviral Drug Resistance" (VIRGIL). Unión Europea FP6-503359. 2004-2007.

Biología Molecular y celular de la replicación del virus de la gripe. Plan Nacional de Investigación Científica y Técnica BFU2004-00491/BMC. 2005-2007.



TESIS DOCTORALES

Pablo Gastaminza Landart (2003).

La subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe es esencial para la replicación viral.
Universidad Autónoma de Madrid.

Ana M. Falcón Escalona (2003).

La proteína NS1 del virus de la gripe: Actividades nucleares y citosólicas e implicaciones en la patogénesis viral.
Universidad Autónoma de Madrid.

Estela Area Gómez (2004).

Modelos tridimensionales de la ribonucleoproteína y la polimerasa del virus de la gripe.
Universidad Autónoma de Madrid.

Patricia Villacé Lozano (2004).

Caracterización de los complejos ribonucleoproteicos que contienen la proteína humana Staufen. Implicación en el transporte y traducción localizada de RNAs mensajeros.

Universidad Autónoma de Madrid.

Índice sección

Índice general

HOME

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TOROVIRUS



Dolores Rodríguez Aguirre

Resumen

Los torovirus son virus con envuelta, con un genoma RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, y cuyas partículas son muy pleomórficas. Estos virus fueron identificados por primera vez en 1972, y han sido incluidos recientemente como un nuevo género dentro de la familia *Coronaviridae*. Los escasos estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintos países indican que los Torovirus pueden

ser una importante causa de gastroenteritis tanto en la población humana como en distintas especies animales de gran importancia en ganadería. A pesar de ello, y de su amplia distribución geográfica, y de su capacidad para infectar una gran variedad de especies animales, estos virus han sido muy pobremente caracterizados. Entre las mayores dificultades para su estudio se encuentran la imposibilidad de crecer los torovirus en células en cultivo a excepción de un aislado equino (BEV), que corresponde al primer torovirus identificado.

El primer objetivo del laboratorio al iniciar este proyecto fue la obtención de herramientas que nos permitieran abordar el estudio de la biología molecular de torovirus, y desarrollar sistemas de diagnóstico con los que determinar su incidencia en la población humana, así como en la industria ganadera. Para ello, se han utilizado sistemas heterólogos (recombi-

nantes de baculovirus y del virus vaccinia) para la expresión de las proteínas estructurales de BEV. Esto nos permite estudiar sus características en ausencia de la infección por el virus BEV, y purificar estas proteínas para, por una parte, producir anticuerpos policlonales y monoclonales específicos, y por otra, utilizarlas como antígeno para la detección de sueros positivos frente a torovirus. Con los anticuerpos obtenidos podremos hacer un seguimiento de las proteínas durante el proceso morfo-genético tanto por microscopía confocal como por inmunomicroscopía.

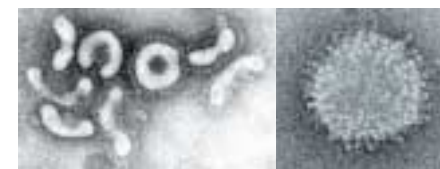
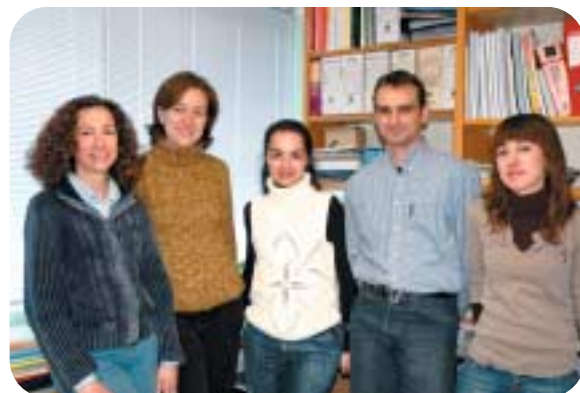


Figura 1. Partículas purificadas del torovirus equino BEV observadas por microscopía electrónica.

PERSONAL



Jefe de Línea:

Dolores Rodríguez Aguirre

Becarios Predoctorales:

Soledad Blanco Chapinal

Ana Garzón Gutiérrez

Ana M^a Maestre Meréns (desde Marzo de 2003)

Jaime Pignatelli Garrigós (desde Sept. de 2003)

Índice sección

Índice general

HOME

PUBLICACIONES

Ramiro, M.J., Zarate, J.J., Hanke, T., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J.A. and Larraga, V. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**, 2474-2484.

González-Aseguinolaza, G., Nakaya, Y., Molano, A., Dy, E., Esteban, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Palese, P. and García-Sastre, A., Nussensweig. (2003). Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J. Virol.* **77**, 11859-11866.

Gallego, J.C., Risco, C., Rodríguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J.L. and Esteban, M. 2003. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol.* **77**, 10606-10622.

Gómez, C.E., Abaitua, F., Rodríguez, D. and Esteban, M. (2004). Efficient CD8+ T cell response to HIV-env V3 loop epitope from multiple isolates by a DNA prime/vaccinia virus boost (rWR and rMVA strains) immunization regime and enhancement by the cytokine IFN- γ . *Virus Research* **105**, 11-22.

PROYECTOS CIENTÍFICOS

Dolores Rodríguez-Aguirre.

Vectores multiepitópicos como vacuna contra malaria.

Ministerio de Ciencia y Tecnología. CICYT (BIO 99-0803). 47.118 €, 2000-2003.

Dolores Rodríguez-Aguirre.

Morfogénesis del virus vaccinia: estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos.

Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 082.2/0042.1/2000). 25.224 €, 2001- 2002.

Dolores Rodríguez-Aguirre.

Torovirus humano: caracterización genética y funcional. Desarrollo de herramientas para su diagnóstico en clínica.

Ministerio de Ciencia y Tecnología. CICYT (BIO 2002-03739), 2003-2006. 117.300 €.



PATENTES

Rodríguez Aguirre, J.F., Ruiz Castón, J., González Llano, M.D., Rodríguez Aguirre, M.D., Blanco Chapinal, S., Oña Blanco, A., Salgar Gómez, I., Abaitua Elustondo, F., Luque Buzo, D. and Rodríguez Fernández-Alba, J.R.

Cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), su procedimiento de obtención y aplicaciones/ Chimeric empty capsids from the virus causing the infectious bursal disease (IBDV), obtention procedure and applicatons.

CSIC y BIONOSTTRA S.L.

Nº de solicitud 200400120. Ampliación a patente internacional PCT/EP2005/000695

Índice sección

Índice general

HOME

BIOLOGIA MOLECULAR DE BIRNAVIRUS



José F. Rodríguez-Aguirre

Resumen

Los virus pertenecientes a la familia *Birnaviridae* se caracterizan por la posesión de una cápsida icosaédrica, formada por una única capa proteica, que encierra un genoma dsRNA bipartito. Entre los miembros de esta familia se encuentran patógenos de gran importancia económica para la industria avícola y piscícola. Los sistemas de control de

enfermedades causadas por birnavirus tienen una eficacia muy limitada. La situación epidemiológica del virus de la bursitis infecciosa del pollo (IBDV), nuestro modelo de trabajo fundamental, refleja la precariedad de estos sistemas. El empleo sistemático de programas de vacunación intensivos basados en el empleo de vacunas vivas no ha impedido la dispersión de la enfermedad ni el incremento constante en la virulencia del virus. Nuestro trabajo tiene como finalidad última el desarrollo de estrategias seguras y eficaces para el control de las enfermedades causadas por birnavirus. Este desarrollo requiere un conocimiento preciso de aspectos claves de la biología molecular de este grupo de virus. Nuestro esfuerzo se ha centrado en tres áreas fundamentales: i) Caracterización de la estructura y morfogénesis

viral; ii) Desarrollo de vacunas de subunidad; y iii) Generación de líneas de pollo genéticamente resistentes a la infección por IBDV.

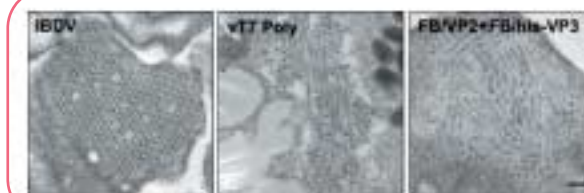


Figura 1. Detección de ensamblados de IBDV formados en diferentes sistemas de expresión. Las imágenes de microscopía electrónica corresponden a fibroblastos embrionarios de pollo infectados con IBDV, células BSC1 infectadas con el virus vacunal recombinante vT7 Poly que expresa la poliproteína de IBDV y a células de insecto H5 coinfectadas con los baculovirus recombinantes FB/pVP2 y FB/his-VP3, respectivamente. La barra indica 250 nm.

PERSONAL



Jefe de Línea:

Jose F. Rodríguez-Aguirre, investigador Científico CSIC
M^a Dolores González de Llano, científico titular OPIS

Becarios Postdoctorales:

Ana M^a Oña
Fernando Abaitua

Becarios Predoctorales:

Roberto Clemente
Aitor Navarro
Yolanda Lorenzo
Laura Delgui

PUBLICACIONES

Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J.F., Lombardo, E. (2003). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid. *J. Virol.* **77**, 2459-2468.

Kochan, G., González, D. and Rodríguez, J.F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* **148**, 723-744.

Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J.A., Caston, J.R., Pazos, F. and Rodríguez, J.F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* **77**, 6438-6449.

Cattoli, G., Terregino, C., Brasola, V., Rodríguez, J.F. and Capua, I. (2003). Development and preliminary validation of an ad hoc N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. *Avian Dis.* **47**: 1060-1062.

Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F. and Rodríguez, J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.* **32**: 47-55.

Eichwald, C., Rodríguez, J.F. and Burrone, O. (2004). Characterisation of rotavirus NSP2/NSP5 interaction and dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* **85**, 625-634.

Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J.R. and Rodríguez, J.F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* **322**, 135-142.

PROYECTOS CIENTÍFICOS

José F. Rodríguez-Aguirre.

Phylogenetic sequence analysis and improved diagnostic assay systems for viruses of the family *Reoviridae*
EU, 199,000, 01-01/06-04.

José F. Rodríguez-Aguirre.

IBDV morphogenesis
Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain, 133,250, 01-01/12-03.

José F. Rodríguez-Aguirre.

Development of IBDV oral vaccines
Comunidad Autónoma de Madrid, Spain, 108.182 , 01-01/12-02.

José F. Rodríguez-Aguirre.

Development of IBDV subunit vaccines
Comunidad Autónoma de Madrid, Spain, 130,000 , 06-03/06-05.

José F. Rodríguez-Aguirre.

Development of IBDV marker vaccines
Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain, 203,500 , 01/12/03-30/11/06.

Índice sección

Índice general

HOME

TESIS DOCTORALES

Roberto Clemente Cervera (2004).

Estudio del papel funcional de la proteína estructural VP3 en el proceso morfogénico del virus de la bursitis infecciosa.
Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.

Índice sección

Índice general

HOME



PATENTES

Rodríguez, J.F., González de Llano, D., Oña, A., Abaitua, F., Maraver, A., Clemente, R., Castón, J.R. and Rodríguez, J.R.
Procedimiento de producción de partículas vacías (VLPs) del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV), composiciones necesarias para su puesta a punto y su uso en la elaboración de vacunas frente al IBDV.
CSIC/ BIONOSTRA S.A.
Patent#: 200300751, date: 31.03.03.

Rodríguez Aguirre, J.F., Ruíz Castón, J., González de Llano, M.D., Rodríguez Aguirre, M.D., Blanco Chapinal, S., Oña Blanco, A.M., Saugar Gómez, I., Abaitua Elustondo, F., Luque Buzo, D., y Rodríguez Fernández-Alba, J.R.
Cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), su procedimiento de obtención y aplicaciones.
CSIC/ BIONOSTRA S.A
Patent#: P200400120, date: 21.01.2004.

Rodríguez, J.F., Ruíz Castón, J., González de Llano, M.D., Oña Blanco, A.M., Abaitua Elustondo, F., Luque Buzo, D. y Rodríguez Fernández-Alba, J.R.
Cápsidas vacías (VLPs(-VLP4)) del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) su procedimiento de obtención y aplicaciones.
CSIC/ BIONOSTRA S.A
Patent#: P200400121, date: 21.01.2004

Ruíz Castón, J., Saugar Gómez, I., Luque Buzo, D., Abaitua Elustondo, F., Oña Blanco, A.M., González de Llano, M.D., Rodríguez Aguirre, J.F. y Rodríguez Fernández-Alba, J.R.
Title: Procedimiento para la producción en levaduras de cápsidas virales vacías compuestas por proteínas derivadas de pVP2 del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV).
CSIC/ BIONOSTRA S.A.
Patent#: P20041044, date: 30.04.04

FORMACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS mRNAs



Carlos M^a Suñé Negre

Resumen

Durante las últimas décadas, hemos aprendido que los mecanismos que regulan la producción de mRNAs maduros (transcripción, capping, splicing y poliadenilación entre otros) son altamente complejos y, aunque bioquímicamente independientes, se encuentran íntimamente relacionados de forma que cada uno de estos procesos influencia la

especificidad y eficiencia del otro.

El objetivo a largo plazo del laboratorio es entender las conexiones físicas y funcionales entre la elongación de la transcripción y el splicing de los mRNAs. A pesar de que la existencia de esas conexiones está ampliamente aceptada, su naturaleza y los mecanismos moleculares que las regulan permanecen por ser dilucidados.

Parte del laboratorio estudia una proteína, el factor de transcripción CA150 que puede ser clave en la regulación de la elongación y el splicing de los mRNAs. Otra parte del laboratorio se encuentra estudiando los mecanismos moleculares de la regulación de la elongación transcripcional por los complejos de la RNAPII.

Los proyectos que se están desarrollando en la actualidad tienen como objetivos:

- i) La caracterización bioquímica y funcional de las conexiones entre CA150 y la maquinaria de splicing.
- ii) El análisis molecular de los complejos de la RNAPII que regulan transcripción.

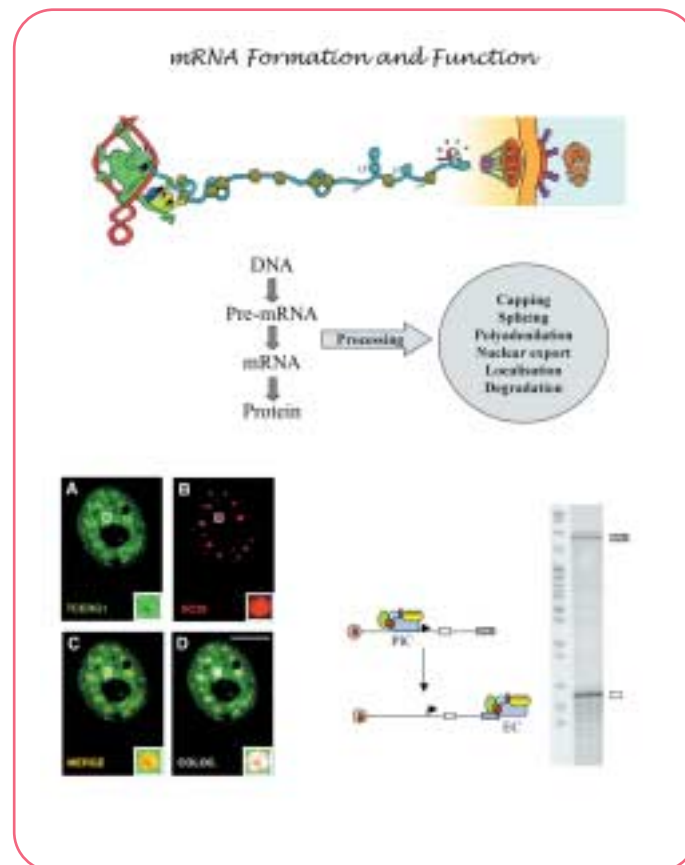


Figura1. Numerosas investigaciones realizadas durante las últimas décadas han demostrado la importancia del control de la transcripción como mecanismo regulador de la expresión génica. El objetivo a largo plazo de nuestra investigación es entender los mecanismos moleculares de la elongación de la transcripción por los complejos de la RNA polimerase II (RNAPII) y sus conexiones con otras etapas del procesamiento del RNA, en particular el splicing de los pre-mRNAs. Los proyectos que se están desarrollando en la actualidad tienen como objetivos: i) La caracterización bioquímica y funcional de las conexiones entre TCRG1/CA150 y la maquinaria de splicing (figura de microscopia confocal, panel izquierdo: TCRG1/CA150 colocaliza en la célula con factores de splicing). ii) El análisis molecular de los complejos de la RNAPII que regulan transcripción (esquema y figura de gel, panel derecho: aislamiento y caracterización de complejos de pre-iniciación [PIC] y elongación [EC] de la transcripción).

PERSONAL



Jefe de Línea:

Carlos M^a Suñé Negre (Científico titular CSIC)

Becarios Predoctorales:

Inmaculada Montanuy Sellart

Marta Gutiérrez Guisado

Miguel Sánchez Álvarez

Índice sección

Índice general

HOME

PUBLICACIONES

Suñé, C., Brennan, L.E., Stover, D.R., and Klimkait, T. (2004). Effect of polymorphisms on the replicative capacity of protease inhibitor-resistant HIV-1 variants under drug pressure. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 119-126.

Índice sección

Índice general

HOME



PROYECTOS CIENTÍFICOS

Carlos María Suñé Negre

Control transcripcional de la expresión génica del VIH-1: papel del coactivador transcripcional CA150 (SAF 2002-02641)
Ministerio de Ciencia y Tecnología, entidades participantes: Centro Nacional de Biotecnología. Madrid. España, desde:
03/2003 hasta: 03/2006.

Índice sección

Índice general

HOME

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA IMMUNE POR VIRUS



Antonio Alcamí

(adscrición temporal desde marzo 2004)

Resumen

El principal objetivo de nuestro laboratorio es el entendimiento de la interacción de virus DNA de gran tamaño (poxvirus y herpesvirus) con el sistema immune del huésped. La batalla entre los virus y el sistema immune ha tenido lugar durante millones de años de co-evolución virus-huésped. Nuestra hipótesis es que los virus han influído en la evolución de varios aspectos de la inmunidad y los genomas virales se pueden considerar repositorios de infor-

mación sobre el sistema immune del huésped. Un mayor entendimiento de las estrategias virales de evasión del sistema immune nos aportará información sobre patogénesis viral, el funcionamiento del sistema immune y nuevas estrategias de modulación immune con aplicaciones terapéuticas.

Nuestra investigación puede dividirse en varias áreas: (1) identificación y caracterización de nuevas proteínas codificadas por poxvirus y herpesvirus que mimetizan receptores de citoquinas del huésped e inhiben la actividad de citoquinas y quimioquinas.; (2) investigaciones en mousepox, una enfermedad causada por el virus ectromelia, como un modelo natural de infección en ratones para entender la contribución de las proteínas virales a la patogénesis y modulación immune; y (3) el desarrollo de proteínas inmunomoduladoras humanas como agentes anti-inflamatorios que pueden utilizarse en la clínica para tratar enfermedades

humanas causadas por una reacción inmunopatológica.

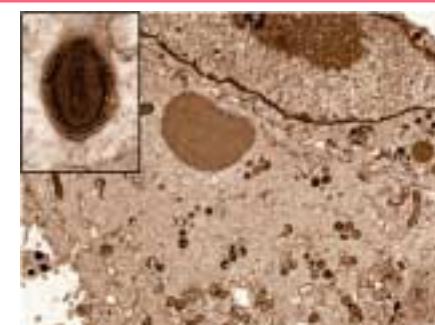


Figura 1. Microscopía electrónica de células infectadas con el virus ectromelia..

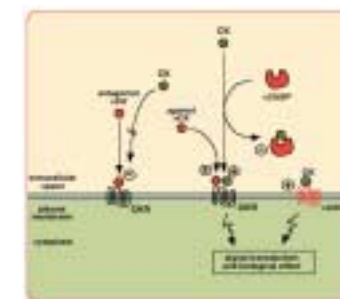


Figure 2. Modulación viral de la actividad de quimioquinas: proteínas virales de unión a quimioquinas (vCCKBP) y mimetismo molecular de quimioquinas (CK) y receptores de quimioquinas (vCKR).

PERSONAL



Group Leader:

Antonio Alcamí (adscripción temporal desde marzo 2004)

Postdoctoral Fellows:

Begoña Ruiz-Argüello

Ali Alejo

Abel Viejo

Edel McNeela

Predoctoral Fellows:

Marcos Palomo

Technical Assistants:

Rocío Martín

Visiting Scientists:

Emma Poole

Department of Medicine, University of Cambridge, UK

Yin Ho

Department of Medicine, University of Cambridge, UK

Gayatri Chavali

Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, UK

PUBLICACIONES

Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A. and Alcamí, A. (2003). Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* **22**, 833-846.

Ribas, G., Rivera, J., Saraiva, M., Campbell, R.D. and Alcamí, A. (2003). Genetic variability of immunomodulatory genes in ectromelia virus isolates detected by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Virol.* **77**, 10139-10146.

Alcamí, A. (2003). Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nature Rev. Immunol.* **3**, 36-50.

Webb, L.M.C., Smith, V.P. and Alcamí, A. (2004). The gammaherpesvirus chemokine binding protein can inhibit the interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *FASEB J.* **18**, 571-573.

Pyo, R., Jensen, K.K., Wiekowski, M.T., Manfra, D., Alcamí, A., Taubman, M.B. and Lira, S.A. (2004). Inhibition of intimal hyperplasia in transgenic mice conditionally expressing the chemokine binding protein M3. *Am. J. Pathol.* **164**, 2289-2297.

Índice sección

Índice general

HOME