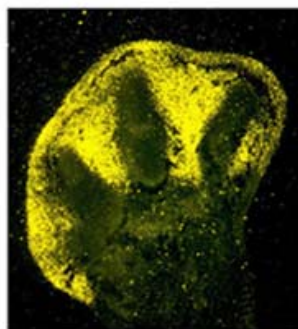
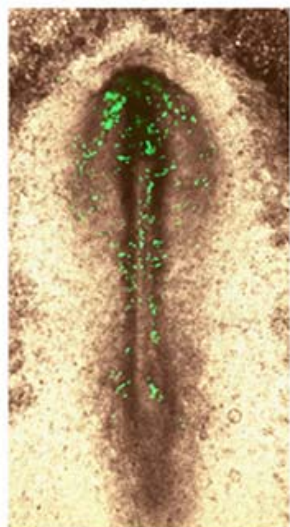
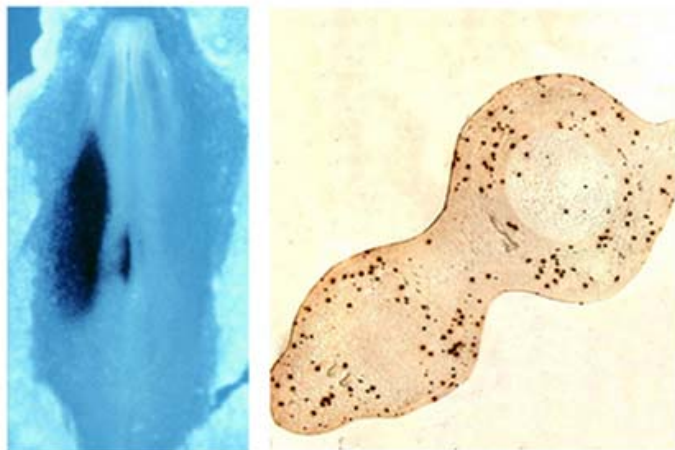


IV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO

19-22 DE SEPTIEMBRE

Paraninfo de la Magdalena

SANTANDER 2004



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL
MENENDEZ PELAYO

con la colaboración de la

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

IV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

COMITÉ ORGANIZADOR

JUAN M. HURLÉ (Presidente)
JUAN A. GARCÍA-PORRERO
MARIAN ROS

COMITÉ CIENTÍFICO

JAUME BAGUÑA
JUAN A. GARCÍA PORRERO
JUAN M HURLÉ
JUAN CARLOS IZPISÚA-BELMONTE
ALFONSO MARTÍNEZ ARIAS
ANGELA NIETO
MARIAN ROS

Secretaría técnica

Sonia Pérez Mantecón

www.ivcsebd.unican.es

Domingo, 19 de Septiembre

PROGRAMA

17 h. a 19 h. Recepción de participantes y entrega de documentación

ACTO INAGURAL

19 h. Acto de apertura (Paraninfo de caballerizas)

19:15 h.: **JUAN CARLOS IZPISÚA BELMONTE**
Células madre: Modelo experimental del desarrollo embrionario
The Salk Institute. La Jolla. USA

20:30 h. Recepción ofrecida por el Exmo. Ayuntamiento de Santander (Palacio)

Lunes, 20 de Septiembre

SESION 1: APOPTOSIS, CRECIMIENTO Y MIGRACIÓN
Moderadores: Juan Aréchaga y Virginio García-Martínez

09:00 h. a 09:30 h. **GINES MORATA**
El papel de la apoptosis en el desarrollo de Drosophila
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC. Madrid

9:45 h. a 10:00 h. Cristina Cruz Rubio, Antonio Garcia-Bellido, y Jose F. de Celis
Identificación y caracterización de genes implicados en el control del tamaño en Drosophila melanogaster.

10:00 h. a 10:15 Héctor Herranz y Ginés Morata
Regulación del tamaño celular: El gen Calderón, un transportador de azúcares regulado por la vía de la insulina en Drosophila

10:15 h. a 10:30 h. J. Bessa and F. Casares
teashirt is a nodal point in the coordination of eye determination and growth in Drosophila

10:30 h. a 10:45 h. Juan Cabello, Ufuk Guenesdogan, Ralf Schnabel
Componentes de la ruta Wnt activan CED-10/Rac para controlar la orientación del huso mitótico, fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y migración celular en C. Elegans.

10:45 h. a 11:00 h. Montse Coll, Pedro Melgar, Berta Alsina, y Fernando Giraldez
BMP4 reduces neuronal output in the otic vesicle

11:00 h. a 11:30 h. Café

- 11:30 h. a 12:00 h. **ANGELA NIETO**
Los factores de transcripción Snail en crecimiento y supervivencia en vertebrados.
Instituto Cajal de Neurociencias. CSIC. Madrid
- 12:00 h. a 12:15 h. Ana Fernández-Miñán, Maria Dolores Martín Bermudo, Acaimo González-Reyes
Migración celular durante la oogenesis en Drosophila
- 12:15 h. a 12:30 h. José María Urbano Fernández y Maria Dolores Martín Bermudo
Fly gut: a model for cell migration
- 12:30 h. a 12:45 h. Siro Pérez Alcalá, M. Ángela Nieto y Julio A. Barbas
Lsox5 en el desarrollo de la cresta neural cefálica
- 12:45 h. a 13:00 h. Juan Antonio Montero and Carl-Philipp Heisenberg
Germ layer formation at the onset of zebrafish gastrulation
- 13:00 h. a 13:15 h. Blanco, M.J., Barrallo, A., Reyes A.E., Tada, M., Allende, M., Wilson, S. W., Mayor R., and Nieto, M.A.
The role of Snail1b in convergence and extension movements in the zebrafish embryo
- 13:15 h a 13:30 h Aixa V. Morales y M. Angela Nieto
Análisis funcional de los genes de la familia Snail durante la somitogenesis
- 14:00 a 14:30 h Almuerzo (comedor del Palacio)

SESION 2:

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Moderadores: Paola Bovolenta y Salvador Martínez

- 16:30 h. a 16:45 h. Nuria T. Villagrà, Joaquín Navascués, José P. Vaqué, Miguel Lafarga y María T. Berciano
Dinámica de las inclusiones intranucleares enriquecidas en PABPNI de las neuronas oxitocinérgicas de la rata durante el desarrollo postnatal.
- 16:45 h. a 17:00 h. Joaquín Navascués, M. Lafarga y M. T. Berciano
Neuritogénesis y reorganización de los cuerpos nucleares durante la diferenciación neuron-like de las células UR61

- 17:00 h. a 17:15 h. David Bueno, Angel Gato, Carolina Parada, Cristina Martín y Rufo Martín
Análisis proteómico del fluido cerebroespinal embrionario: implicación de la presencia de proteínas relacionadas con la génesis de enfermedades neurodegenerativas
- 17:15 h. a 17:30 h. Echevarria, D., Belo, JA, and Martinez S
The precise control of the FGF8 activity in the mammalian Isthmic organizer
- 17:30 h. a 17:45 h. Aragón, F., Cereghini, S., Alsina B., Giraldez, F., Pujades C.
VHnfl is involved in specification of caudal hindbrain molecular identity in chick
- 17:45 h. a 18:00 h. Martínez S., Echevarria, D., Martín G.
Midbrain and cerebelar morphogenesis are precisely controlled by dosage of FGF signaling
- 18:30 h. a 19:00h **JUAN MODOLELL**
Nuevos genes que participan en el desarrollo temprano del sistema nervioso de Drosophila
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC. Madrid
- 19:00 h. a 21:00 h. Sesión de posters
- 21:00 Bufet (Recinto de Caballerizas)

Martes, 21 de Septiembre

SESION 3:

VIAS DE SEÑALIZACIÓN

Moderadores Juan Pablo Couso y Fernando Casares

09:00 h. a 09:30 h.

ALFONSO MARTINEZ ARIAS

Integración de señales durante la diversificación celular

Universidad de Cambridge. U.K.

9:45 h. a 10:00 h.

Joaquín Grego, José María Pérez-Pomares, Angel Raya, Luis Luna, Juan Carlos Izpisúa Belmonte y José Luis de la Pompa

Notch regula desarrollo cardiaco en vertebrados

- 10:00 h. a 10:15 h. Virginio Garcia-Martínez, Carmen López Sánchez y Natividad García Masa
Patrón de expresión génica durante la migración de las células precardiogénicas desde la línea primitiva hasta su localización en el corazón tubular.
- 10:15 h. a 10:30 h. Carmen López-Sánchez, María Luisa López-Gracia, Marian Ros y Virginio García-Martínez
Análisis experimental del papel de la señalización por FGFs en la cardiogénesis mediante electroporación in vitro.
- 10:30 h. a 10:45 h. Lourdes Acosta, Hanying Cheng, Maria del Pilar de Castro, Weinian Shou y Diego Franco.
BMP10 es esencial para el correcto desarrollo morfológico y funcional del corazón embrionario.
- 10:45 h. a 11:00 h. Mario Torrado, Beatriz Nespereira and Alexander T. Mikhailov
A novel model of cardiomyopathy in neonatal piglets uncovers essential insights of the fetal cardiogenic genes into heart postnatal maturation and heart disease.
- 11:00 h. a 11:30 h. Café
- 11:30 h. a 12:00 h. **MARCOS GONZALEZ GAITAN**
Tráfico endocítico en la señalización morfogenética
Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology. Dresden. Alemania.
- 12:00 h. a 12:15 h. Jabier Gallego Llamas, Julient Vermont, Valérie Fraulob, Pierre Chambon and Pascal Dollé
Embryonic retinoic acid coordinates left-right somitogenesis
- 12:15 h. a 12:30 h. Cristina Molnar y José F. de Celis
Búsqueda de genes implicados en el desarrollo y diferenciación de las venas del ala de Drosophila melanogaster.
- 12:30 h. a 12:45 h. C. Brass-Pereira, J. Bessa and F. Casares
Odd genes induce retinal differentiation initiation through the activation of hedgehog
- 12:45 h. a 13:00 h. Josana Rodríguez, José María Ruiz, Pilar Esteve, Christine Weinl, Françoise Trousse, Christine Holt y Paola Bovolenta
SFRP1 actúa como molécula de guía axonal para las células ganglionares de la retina.

- 13:00 h a 13:15 h Gina Abelló, Fernando Giráldez, Berta Alsina
Early regionalization in the inner ear: involvement of Notch pathway
- 13:15 h a 13:30 h Rosa Barrio, y José F. De Celis
dSki, un nuevo factor implicado en la vía de señalización de TGF- β en *Drosophilla melanogaster*.
- 14:00 a 14:30 h Almuerzo (comedor del Palacio)
- SESION 4: CELULAS MADRE Y DIFERENCIACIÓN CELULAR**
Moderadores: José Becerra y Ramón Muñoz-Chápuli
- 16:30 h. a 17:00 h. **PEDRO HERRERA**
Especificación de los linajes celulares pancreáticos
Universidad de Ginebra. Suiza
- 17:00 h. a 17:30 h. **MARCO MILAN**
Subdivisión dorsal-ventral del ala de Drosophila
Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona
- 17:45 h. a 18:00 h José A. Andrades, Silvia Claros, Christopher Murphy, Ravinder N. Maini, José Becerra
La sangre como fuente de células madre mesenquimáticas
- 18:00 h. a 18:15 h John Pearson and Acaimo Gonzalez-Reyes
Identificación of gene targets of Drosophila female stem cell niche signalling- a microarray approach.
- 18:15 h. a 18:30 h Gato A., Alonso M.I., Moro J.A., Callejo S., Mateo R., Parada C. Bueno D. Martín C
Neuroepithelial stem cells behaviour regulation in chick embryos
- 18:30 h. a 18:45 h Muñoz-Chápuli, R., González-Iriarte, M., Carmona R., Guadix, J.M., Pérez-Pomares, J.M., Ijenberg, A, Hastie, N.D.
El gen supresor del tumor de Wilms (WT1) está implicado en el desarrollo visceral mediante el control de la diferenciación de las células derivadas del epitelio celómico.
- 18:45 h. a 19:00 h Silvia Muñoz-Descalzo y Nuria Paricio
cabut codifica un factor de transcripción tipo C2H2 requerido durante el proceso de cierre dorsal en Drosophila.
- 19:00 h. a 21:00 h. Sesión de posters

Miércoles, 22 de Septiembre

SESION 5:

ORGANOGENESIS

Moderadores: Acaimo González-Reyes y Juan M. Hurlé

9:00 h. a 9:30 h.

MARIAN ROS

Desarrollo temprano de las extremidades de los vertebrados

Universidad de Cantabria

9:45 h. a 10:00 h

Carolina Minguillón, Jo del Buono and Malcolm Logan

Tbx5, Tbx4 y Pitx1: crecimiento o identidad de las extremidades de vertebrados.

10:00 h. a 10:15 h.

David Garciadiego-Cázares, Carlos Rosales, Masaru Katoh and Jesús Chimal-Monroy

Coordination of Chondrocyte Differentiation and Joint formation by $\alpha5\beta1$ integrin in the developing appendicular skeleton

10:15 h. a 10:30 h

Galindo, M I, Pueyo, J. I., Bishop, S. A., Butler, M., and Couso J.P.

Cell signalling, morphogenesis and pattern formation during Drosophila limb development.

10:30 h. a 10:45 h.

M^a Félix Bastida, M^a Dolores Delgado, Marian Fernández-Terán, Marian Ros

Análisis del mecanismo por el que Shh controla la apoptosis en el desarrollo de la extremidad

10:45 h. a 11:00 h.

E. Ulloa, V. Lecaudey, S. Schneioder-Maunory, C. Pujades

Mutation of vhnf1 results in mis-patterning of the otic vesicle in zebrafish.

11:00 h. a 11:30 h.

Café

11:30 h. a 11:45 h

Tristan Rodríguez

Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm

11:45 h. a 12:00 h

Paulo S. Pereira, S. Pinho, J.P. Couso and F. Casares

wingless regulation in the head primordium of the Drosophila eye imaginal disc

12:00 h. a 12:15 h

L. De Navas, M. Suzanne, C. Alonso, H. Reed, R. Barrio, M. Akam, E. Sánchez-Herrero

Estudio funcional de los genes Hox en el desarrollo de los halterios

12:15 h a 12:30 h. James Castelli-Gair Hombria
Activación génica concertada por el gen Hox Abd-B modula propiedades celulares básicas para inducir la formación de un órgano específico de segmento.

12:30 h. a 13:30 h. **Reunión plenaria de la SEBD**

14:00 a 14:30 h Almuerzo (comedor del Palacio)

SESION 7: EVO-DEVO Y DESARROLLO DE PLANTAS
Moderadores: Fernando Giráldez y Juan A. Garcia-Porrero

16:30 h. a 17:00 h. **JAUME BAGUÑA**
Origen y evolución de los organismos con simetría bilateral: de la filogenia molecular a la Evo-Devo funcional
Universidad de Barcelona

17:00 h. a 17:15 Jordi García-Fernández, Elia Benito-Gutierrez, Joseph Gardenyes, Anna Rosanas & Senda Jiménez-Delgado
La complejidad de los vertebrados: más allá de la duplicación génica.

17:15 h. a 17:45 h. **PILAR CUBAS**
Control genético del desarrollo de meristemos axilares
Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid

17:45 h. a 18:00 h. Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, JJ, Ochando, I, Ferrándiz C, Vera A., Martínez-Laborda, A.
ASI participa en el desarrollo del ovario de Arabidopsis thaliana, regulando negativamente a KNAT1

18:00 h. a 18:15 h. Juan José Ripoll, Cristina Ferrándiz, Antonio Martínez-Laborda y Antonio Vera.
PEPI, un gen involucrado en la morfogénesis del fruto de Arabidopsis thaliana.

CLAUSURA DEL CONGRESO.

Moderador: ANTONIO GARCIA BELLIDO

18:30 h. **ENRIQUE CERDA OLMEDO**
ALFONSO MARTINEZ ARIAS
Recuerdo del Prof. José Campos Ortega

19:00 h.

CLAUDIO STERN

Construyendo el sistema nervioso central: una disección molecular del mecanismo de inducción neural

University College London. U.K.

21:30 h.

Cena de Clausura

Molecular mechanisms of stem cell renewal

Atsushi Suzuki, Takaaki Matsui, Kinichi Nakashima, Yasuhiko Kawakami, Angel Raya, Concepcion Rodriguez Esteban, Fred H. Gage, and **Juan Carlos Izpisua Belmonte**

The Salk Institute for Biological Studies
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
belmonte@salk.edu

Embryonic stem cells are truly amazing and remarkable. They link the gap between the fertilized egg, our origin, and the complex architecture of a fully developed organism. Embryonic stem cells are self-renewing cells found in the blastocyst inner cell mass, which have the ability to generate all three germ layer derivatives. Despite their importance in the field of developmental biology and their potential use in the field of tissue engineering, very little is understood about the molecular and cellular mechanisms responsible for the symmetrical self-renewal of stem cells. Leukemia inhibitory factor (LIF)/Stat 3 signaling is the only pathway known to be involved in self-renewal of MESCs. We will present results uncovering a mechanism in which the homeodomain protein, Nanog, is upregulated by the mesoderm specific transcription factor, Brachyury, in cooperation with LIF/Stat 3 signaling, during stem cell renewal. Our results suggest that Nanog is able to induce regeneration of pluripotent stem cells from mesoderm precursors by interfering with Smad transcriptional activity. Identification of the molecular mechanisms of stem cell renewal will be critical to understanding the developmental and physiological regulation of stem cell mediated tissue generation, turn-over and repair.

Identificación y caracterización de genes implicados en el control del tamaño en *Drosophila melanogaster*.

Cristina Cruz Rubio, Antonio García-Bellido y Jose F. De Celis

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Universidad Autónoma de Madrid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

El tamaño que alcanzan los organismos pluricelulares forma parte de su programa de desarrollo, aunque también está afectado por factores externos tales como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura ambiental. Una de las rutas mejor caracterizadas en cuanto a su papel en el control del tamaño de los órganos es la ruta del *Receptor de Insulina (Inr)*, que regula tanto proliferación como tamaño celular. Otros genes que controlan el crecimiento son *Ras*, el protooncogén *dMyc*, el complejo *Cyclin D/cdk4* y los genes supresores de tumores *TSC1* y *TSC2*. Con objeto de identificar y caracterizar funcionalmente nuevos genes implicados en el control del tamaño, hemos realizado una mutagénesis de exceso de función en la que hemos generado y testado 3500 inserciones EP con una línea Gal4 de expresión restringida en el ala de *Drosophila* (*salPE-Gal4*). De las 3.500 inserciones, 296 (8,45%) afectan al tamaño y/o patrón del ala en combinación con *salPE-Gal4*, y de estas, el 41,54% afectan principalmente el tamaño. Hemos mapeado el sitio de inserción del elemento P en 247 de las líneas seleccionadas, obteniendo inserciones en 188 sitios genómicos independientes. Los genes que flanquean a estas inserciones, y que son susceptibles de ser responsables de los fenotipos, hacen un total de 260. Estos se pueden clasificar en base a la función biológica de las proteínas que codifican en los siguientes grupos: 1) reguladores transcripcionales (23,07%), 2) elementos de señalización (13,85%), 3) proteínas de adhesión y del citoesqueleto (3,85%), 4) responsables del metabolismo de proteínas (8,85%) y del metabolismo de ácidos nucleicos (7,69%), 5) transportadores y canales (2,69%), 6) otros (25%) y 7) desconocidos (15%).

Regulación del tamaño celular: El gen Calderón, un transportador de azúcares regulado por la vía de la Insulina en Drosophila

Héctor Herranz y Ginés Morata.

CBMSO-UAM. Madrid.

Durante el desarrollo normal, los procesos de crecimiento celular y crecimiento del organismo están finamente regulados. Cada célula, así como cada órgano, integra información sobre la disponibilidad de nutrientes, señalización hormonal y programas intrínsecos de crecimiento. La descripción de las vías de señalización implicadas en este proceso y de cómo están integradas, es importante para entender de qué manera el crecimiento está regulado durante el desarrollo. La vía de la Insulina (InR) promueve el crecimiento celular en Drosophila en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Aunque se conoce bastante sobre los distintos elementos de transducción de la vía, se conoce bastante poco sobre los efectores que responden a esta vía de señalización (factores de transcripción, transportadores de nutrientes, etc), responsables de los fenómenos de crecimiento. En un screening realizado en el laboratorio, hemos identificado un nuevo gen en Drosophila, el gen Calderón (Clr), que codifica para un transportador de azúcares. Hemos visto que las células mutantes para la función del gen Clr muestran una menor tasa de proliferación y son más pequeñas que las células tipo silvestre (fenotipo éste, reminiscente del de los mutantes que disminuyen los niveles de actividad de la InR); además, son eliminadas por un proceso de competición celular. Por otro lado, hemos visto que la estimulación del crecimiento por parte de la InR precisa de la función de Clr. Finalmente, la InR regula los niveles de expresión del gen Clr. Nuestros resultados demuestran que el gen Clr es un transportador de azúcares que responde a los niveles de actividad de la InR y es necesario para los procesos de crecimiento.

***teashirt* is a nodal point in the coordination of eye determination and growth in *Drosophila*.**

J. Bessa and F. Casares

CABD –Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD). Univ. Pablo de Olavide-CSIC, Sevilla.

teashirt (*tsh*) encodes a *Drosophila* zinc-finger transcription factor that has been involved in two antagonistic processes: eye repression and eye differentiation (1-3).

In late larval eye discs –the larval precursors of the adult eye–, *tsh* is expressed anterior to the morphogenetic furrow in two different cell populations: the (undifferentiated) dividing population at the most anterior part of the disc, and in the pre-proneural population of cells adjacent to the furrow which are stalled in G1 (domains II and III, respectively, in Bessa et al., 2002 (2)).

Here we show that the transcriptional upregulation of *tsh* in the eye imaginal disc starts during early second larval stage, and coincides temporally and spatially with the first epithelial morphological changes observed only in the cells of the primordium of the prospective eye. Furthermore, we show that the overexpression of *tsh* in the peripodial epithelium of the eye disc, which otherwise do not contribute to the eye tissue, is enough to re-specify peripodial identity into prospective eye identity, being able to generate ectopic eyes in this epithelium, something neither *Pax 6/eyeless* nor the retinal gene *eyes absent* are capable of doing by themselves. These results place *tsh* upstream the eye specification pathway. In addition, *tsh* is able to activate the proneural gene *atonal* (4), suggesting that *tsh* can contribute to the specification of neuronal fate during the development of the eye.

Ectopic expression of *tsh* is also able to induce overgrowths in the eye imaginal disc. The analysis of some target genes of proliferation pathways points to Tsh as a mediator of Wingless/Wnt1 activity, therefore assigning to *tsh* a role in the control of disc growth.

In this study we identify *tsh* as one nodal point at the crossroad between different processes in fly eye development: cell proliferation, eye competence specification and neuronal fate assignment.

1- Pan D, Rubin GM. 1998. Targeted expression of *teashirt* induces ectopic eyes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(26):15508-12.

2- Bessa J, Gebelein B, Pichaud F, Casares F, Mann RS. 2002 Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes Dev*. 16(18):2415-27.

3- Singh A, Kango-Singh M, Sun HY. 2002. Eye suppression, a novel function of *teashirt*, requires Wingless signaling. *Development*. 129(18):4271-80.

(4) - Jarman, A.P., Grell, E.H., Ackerman, L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. 1994. *Atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**: 398–400.

Componentes de la ruta Wnt activan CED-10/Rac para controlar la orientación del huso mitótico, fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y migración celular en *C.elegans*.

Juan Cabello, Ufuk Guenesdogan, Ralf Schnabel

Institute of Genetics
Technical University of Braunschweig
Spielmann Str. 7, 38106, Braunschweig, Germany

La especificación del destino y la correcta localización de las células durante la embriogénesis requiere una fina coordinación, de modo que la expresión de genes específicos queda establecida mediante precisas interacciones entre células vecinas. En el embrión de *C.elegans*, componentes de la ruta Wnt poseen esa doble función.

En este trabajo documentamos que mutantes en la ruta Wnt desde *mom-5*/Frizzled a *gsk-3* tienen defectos no sólo en la correcta orientación del huso mitótico tal como ha sido descrito anteriormente (Rocheleau et al. 1997; Thorpe et al. 1997; Schlesinger et al. 1999), sino también en fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y migración de las células del extremo distal de la gónada (DTC). Nosotros mostramos que todos esos defectos están presentes en el mutante nulo *ced-10/rac* así como en el doble mutante *ced-1;ced-5* (Scavenger receptor; Dock180). Ambos genes son elementos de dos rutas diferentes que convergen para regular *ced-10/Rac*.

Además, utilizando experimentos genéticos, demostramos que *ced-10/rac* actúa por debajo de *mom-5*/Frizzled. Esta ruta (*mom-5* → *gsk-3* → *ced-10*) es activada por diferentes ligandos para las diversas funciones. Así, *mom-2*/Wnt regula la orientación del huso mitótico estableciendo la correcta topología del embrión temprano de *C.elegans*. El preciso "vecindario" entre células permite posteriormente la correcta especificación del destino celular mediante interacciones celulares dependientes de Delta-Notch y de Wnt. Gusanos homocigotos mutantes para *egl-20*, otro homólogo Wnt, muestran defectos en la migración de la gónada; pero los otros fenotipos descritos son normales. Finalmente, ninguno de los homólogos Wnt en *C.elegans* muestra un defecto significativo en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos sugiriendo que, o bien *mom-5*/Frizzled funciona autónomamente en este proceso, o existe otro ligando que permanece desconocido.

BMP4 reduces neuronal output in the otic vesicle.

Montse Coll, Pedro Melgar, Berta Alsina & Fernando Giraldez,

DCEXS, Universitat Pompeu Fabra-PRBB, Barcelona

The generation of otic neurones from multipotent progenitors involves the interplay between intrinsic and extrinsic factors. BMP4 and FGF10 are distinctly expressed during otic development anticipating proneural and sensory domains. FGF10 is known to be required for neuroblast determination (Alsina et al., 2004). Here we analyzed the effects of the extracellular factor BMP4 on the determination of otic neurons. BMP4 mRNA was expressed in stage 18-19 otic vesicles, at the anterior and posterior poles. SMAD1P, one intracellular target of BMP4, was also detected in the same domains, and excluded from delaminating neuroblasts. Experiments on isolated otic vesicles showed that BMP4 (20-100 ng/ml) decreased *NeuroD* expression in the *proneurosensory* (proNS) domain. Expression persisted in the CVG indicating that BMP4 did not have any effect after neuroblasts determination. The size of the *otic vesicle* (OV) was also decreased at high concentrations, but *NeuroD* expression on *cochleovestibular ganglion* (CVG) was unchanged. The effect of BMP4 was not prevented by FGF10. This result indicates that BMP4 inhibits neurone generation in the otic epithelium. To further analyse the mechanism of action of BMP4, we assayed cell proliferation, cell death and specification of otic progenitors. BrdU incorporation showed that BMP4 was able to reduce cell proliferation in a fraction, but not all progenitors within the proNS domain. Interestingly, the BMP extracellular inhibitor, Noggin, did also reduce cell proliferation, suggesting that a narrow BMP4 concentration range is required to maintain progenitor cell proliferation. Cell death analyzed by TUNEL assay revealed that low concentrations of BMP4 (20 ng/ml) induced cell death within the proNS domain, but not in other regions of the OV or the CVG. Taken together, the results suggest that BMP4 regulates otic neuronal output by modifying proliferation of progenitors and survival of epithelial neuroblasts. We like to propose that the balance of FGF and BMP4 may underlie the fate of otic progenitors.

Alsina B., Abello G., Ulloa E., Henrique D., Pujades C., Giraldez F. (2003). FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. *Dev. Biol.* 267:119-134

BMC2002-00355 y XT G03/203 ISCIII

Los factores de transcripción Snail en crecimiento y supervivencia en vertebrados

M. Angela Nieto

Instituto Cajal, CSIC. Doctor Arce, 37, 28002 Madrid.

La familia Snail de factores de transcripción está implicada en procesos que conllevan movimientos celulares tanto durante el desarrollo embrionario como en la progresión tumoral. Son fundamentales para la formación del mesodermo y la cresta neural y para la adquisición de propiedades migratorias e invasivas en tumores por medio de la inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM). Por lo tanto, los genes Snail juegan un papel fundamental tanto en las TEM fisiológicas como en las patológicas.

Recientemente, hemos encontrado que además de inducir TEM, Snail bloquea el ciclo celular y confiere resistencia a la muerte, con implicaciones importantes en el comportamiento de las células embrionarias y tumorales cuando adquieren capacidad migratoria e invasiva. Aunque una desregulación/aumento en proliferación es esencial para la formación y el crecimiento tumoral, esto no es así para la malignización. Por otra parte, la resistencia a la muerte conferida por Snail proporciona una ventaja selectiva a las células embrionarias para migrar y colonizar territorios distantes y a las células tumorales para separarse del tumor primario, invadir y formar metástasis.

Además de su influencia en las células migratorias normales y tumorales, la capacidad de Snail de disminuir proliferación y promover supervivencia se utiliza en otros contextos del desarrollo embrionario y fetal, que cuando se desregulan dan lugar a patologías. Discutiré resultados recientes que muestran que la expresión patológica de Snail está asociada a: (i) Supervivencia patológica de las células epiteliales dando lugar a paladares abiertos y (ii) Defectos asociados al desarrollo del sistema cartílago-hueso.

Migración celular durante la oogénesis en *Drosophila*

Ana Fernández-Miñán, Maria Dolores Martín Bermudo, Acaimo González-Reyes

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), C.S.I.C.

La migración celular es el movimiento coordinado de las células sobre un sustrato. La regulación de este proceso es esencial, algo que se pone de manifiesto en procesos como la metástasis, debidos a fallos en los mecanismos que regulan los fenómenos de migración.

Nuestro proyecto de investigación se centra en el estudio a nivel genético y molecular de los mecanismos que controlan la migración celular. Nuestro sistema modelo es la oogénesis de *Drosophila*.

La formación de gametos requiere dos tipos celulares: células de la línea germinal y células de origen somático. Las células somáticas forman un epitelio folicular sobre las células de la línea germinal (15 células nutricias y 1 oocito). En este epitelio, un grupo de 6 a 8 células foliculares, denominadas “**border cells**” (BCs), sufren una transición epitelio-mesénquima, se delaminan del epitelio folicular y migran entre las células nutricias hasta alcanzar la membrana del oocito.

La ruta JNK es una vía de señalización que consta de una cascada de MAP kinasas (*misshapen*, *slipper*, *hemipterous*, *basket*), de un factor de transcripción (*Djun*) y de un mecanismo de retroalimentación negativa llevado a cabo por una MAP quinasa fosfatasa (*puckered*).

El análisis de la falta de función de distintos componentes de la ruta JNK, así como de la sobreexpresión del regulador negativo, han puesto de manifiesto el papel de esta ruta en el proceso de migración de las BCs. Tanto la sobreexpresión de *puc*, como la falta de función de *hep* y *Djun*, provocan un retraso en la migración de las BCs, aunque ésta no se interrumpe totalmente. Por el contrario, en el caso de *misshapen* (primer componente identificado de la ruta), la migración de las BCs se encuentra totalmente bloqueada, lo que sugiere la intervención de *misshapen* en otras rutas de señalización.

Fly gut: a model for cell migration

Jose María Urbano Fernández, María Dolores Martín Bermudo

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC.

The *Drosophila melanogaster* gut provides us an excellent system to investigate the mechanisms that regulate cell migration. The *Drosophila* midgut is composed of two germ layers, visceral mesoderm and endoderm. During gastrulation the visceral mesoderm cells involute and come to lie laterally along the interior surface of the ectoderm. The endoderm has two spatially separated primordia, the anterior situated at the anterior-ventral limit of the embryo and the posterior located at the posterior pole. The formation of the endodermal part of the midgut involves the extensive migration of these two primordia over the visceral mesoderm, which is the most prominent example of cell migration in *Drosophila*. Two deficiency screens for genes involved in internal morphogenesis led to the identification of one deficiency, Df(2L)30A-C, where migration and fusion of the midgut primordia does not occur, with the endodermal cells remaining at their initial site of invagination. We have now identified a smaller deficiency in the region, Df(2L)s1402, which shows the same phenotype. We have analysed the visceral mesoderm of embryos carrying this deficiency and showed that it is wild type. This suggests that the deficiency removes a gene/s required in the endodermal cells for their migration, rather than in the substrate. By complementation and phenotypic analysis of several deficiencies and mutants in the region, we have been

able to narrow down the area containing the gene/s responsible for the migration phenotype to a 100 Kbs. Using the various genetic tools available in *Drosophila*, we are now generating smaller deficiencies in the area. By analysing phenotypically and molecularly the deficiencies generated, we hope to identify the gene/s required for endodermal cell migration.

LSox5 en el desarrollo de la cresta neural cefálica

Siro Pérez Alcalá, M. Ángela Nieto y Julio A. Barbas

Instituto Cajal CSIC. Madrid

El factor de transcripción LSox5 se expresa mayoritariamente en la cresta neural cefálica premigratoria y migratoria durante el desarrollo del embrión de pollo. El inicio de su expresión en la región dorsal del tubo neural es ligeramente posterior al de los factores *Slug*, *Sox9* y *FoxD3*, típicamente relacionados con la generación de la cresta neural. Más tarde, la expresión de LSox5 se mantiene en algunos derivados de la cresta neural, y es requerido para el desarrollo del linaje glial del sistema nervioso periférico, que incluye las células de Schwann y la glía satélite de los ganglios craneales.

En ensayos de sobre-expresión, LSox5 produce la inducción inmediata de *RhoB* en cualquier punto del eje dorso-ventral del neuroepitelio. El efecto de la sobre-expresión prolongada de LSox5 consiste en la extensión, tanto del dominio dorsal de competencia, como del período de generación de cresta neural. En consecuencia, da lugar a una sobreproducción de cresta neural cefálica. Estos datos localizan el papel funcional de LSox5 por debajo de los factores de transcripción considerados generadores de cresta neural, e inmediatamente por encima de los efectores implicados en la transición epitelio-mesénquima.

El hecho de que la expresión de factores instructivos solubles como BMP4, BMP7 y Wnt-1 permanezca inalterada tras la expresión forzada de LSox5, mientras que la expresión factores de transcripción como *Slug*, *Sox9* y *FoxD3* aumenta, sugiere la existencia de mecanismos de retroalimentación en el desarrollo de la cresta neural que no llegarían a controlar a los primeros, pero sí a los segundos.

Germ layer formation at the onset of zebrafish gastrulation

Juan-Antonio Montero and Carl-Philipp Heisenberg

Max-Planck-Institute of Molecular Cell Biology and Genetics
Dresden, Germany

During vertebrate gastrulation, the three germ layers, ectoderm, mesoderm and endoderm are formed and the resulting progenitor cells are brought into the positions from which they will later form more complex tissues and organs. A core element in this process is the internalization of mesodermal and endodermal progenitors at the onset of gastrulation. While many of the molecules that induce mesendoderm have been identified, much less is known about the cellular mechanisms underlying mesendodermal cell internalization and germ layer formation.

By using multiphoton confocal microscopy we show that at the onset of zebrafish gastrulation, mesendodermal progenitors within the germ ring internalize by single cell delamination. Once internalized, mesendodermal (prechordal plate) progenitors in axial regions of the germ ring upregulate E-Cadherin (Cadherin-1) expression, become increasingly motile and eventually migrate along the overlying epiblast (ectodermal) cell layer towards the animal pole of the gastrula. When E-Cadherin function is compromised, prechordal plate progenitors still internalize, but fail to elongate and efficiently migrate along the epiblast, while epiblast cells themselves exhibit reduced radial cell intercalation movements. This indicates that Cadherin mediated cell-cell adhesion is needed within the forming shield for cell intercalation and prechordal plate progenitor cell elongation and migration during early stages of zebrafish gastrulation.

Our data provide insight into the cellular mechanisms underlying mesendodermal progenitor cell internalization and subsequent migration at the onset of zebrafish gastrulation and the role of Cadherin mediated cell-cell adhesion in these processes.

The role of Snail1b in convergence and extension movements in the zebrafish embryo

Blanco, M.J.^a, Barrallo, A.^a, Reyes A.E.^b, Tada, M.^c, Allende, M.^b, Wilson, S. W.^c, Mayor R.^{b,c}, and Nieto, M.A.^a.

^aInstituto Cajal, CSIC, Madrid 28002, Spain; ^bFacultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile; ^cDepartment of Anatomy & Developmental Biology, University College London, UK.

Snail1 is one of the genes where the duplication of the zebrafish genome is most evident. Present as one copy in the terrestrial vertebrates, it exists as two genes in zebrafish: snail1a and snail1b¹. Their combined expression patterns match that of their mammalian orthologue. We have found that in addition to being expressed at the margin during gastrulation², zebrafish *snail1b* is maternally deposited. It becomes later restricted to axial mesoderm, adaxial cells and especially prominent in the prospective neural crest at the neural plate border and the dorsal aspect of the neural tube.

We have performed loss of function analysis of zebrafish snail1b by knock down with two different morpholinos targeted at the proximal 3'UTR and the ATG codon, respectively, and gain of function studies by overexpressing its mRNA. We have found that in addition to its role in neural crest development snail1b function is essential for convergence and extension movements at gastrulation. This role arises from its ability to modulate the expression of adhesion molecules that mediate morphogenetic movements.

1. Locascio, A., M. Manzanares, M. J. Blanco and M. A. Nieto (2002) Modularity and reshuffling of Snail and Slug expression during vertebrate evolution. PNAS 99 (26), 16841-16846.

2. Thisse, C., B. Thisse and J. H. Postlethwait (1995). Expression of Snail2, a second member of the zebrafish Snail family, in cephalic, mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos. Dev. Biol. 172, 86-89

ANALISIS FUNCIONAL DE LOS GENES DE LA FAMILIA SNAIL DURANTE LA SOMITOGENESIS.

Aixa V. Morales y M. Angela Nieto.
Instituto Cajal, CSIC.Madrid.

Los factores de transcripción de la familia Snail están implicados en múltiples procesos tanto durante el desarrollo embrionario como en patologías tales como la progresión tumoral y la fibrosis tras diálisis peritoneal. Entre las funciones básicas de los genes Snail que se han mantenido en el transcurso de la evolución está el control de la transición epitelio-mesénquima (TEM), por la que células epiteliales se disocian de sus tejidos de origen y migran atravesando la matriz extracelular (1). Uno de los procesos embrionarios en el que la TEM resulta esencial es la formación del patrón segmentado del mesodermo de los vertebrados o somitogénesis, (2). El mesodermo paraxial se segmenta en esferas epiteliales (somitas) mediante una transición inversa mesénquima-epitelio (TME). Los somitas se forman de una manera repetitiva con una periodicidad de 90 min (pollo) y 120 min (ratón) que viene controlada por un reloj molecular en el que participan señales de la vía de Notch y de la vía de Wnt (3). Posteriormente, los somitas se diferencian en esclerotomo (precursor del esqueleto axial) y dermomiótomo (precursor de la musculatura axial y de las extremidades y componentes de la dermis), para lo que se requieren nuevas TEMs (4).

Mediante un análisis detallado de la expresión de los miembros de la familia Snail presentes en el mesodermo paraxial, Slug en pollo y Snail en ratón, hemos observado que ambos genes se expresan de una manera dinámica en todo el mesodermo paraxial de manera similar a la de los genes implicados en el reloj molecular de la somitogénesis, tales como *lunatic fringe* y *hairy-2*. La alteración de la expresión dinámica de Slug mediante sobreexpresión por electroporación en el mesodermo paraxial de pollo altera la expresión cíclica de *lunatic fringe* y *hairy-2* y consecuentemente la formación del borde intersomítico. Esto supone la primera evidencia de la integración del control cíclico de la somitogénesis y de la progresiva epitelialización en la formación de los somitas.

1. Nieto, M.A. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, Vol.3, 155-168, (2002).
2. Morales, A.V., Yasuda, Y. & Ish-Horowicz, D. *Dev. Cell*, 3:63-74 (2002).
3. Pourquie, O. *Science*, 301: 328-30 (2003).
4. Brand-Saberi, B. & Christ B. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48:1-42 (2000).

DINAMICA DE LAS INCLUSIONES INTRANUCLEARES ENRIQUECIDAS EN PABPN1 DE LAS NEURONAS OXITOCINERGICAS DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.

Nuria T. Villagrà, Joaquín Navascués, José P Vaqué, Miguel Lafarga y María T. Berciano

Departamentos de Anatomía y Biología Celular y de Biología Molecular, Universidad de Cantabria

Recientemente hemos demostrado que las neuronas oxitocinergicas presentan una inclusión intranuclear (IIN) formada por túbulos, que concentran la proteína de unión a la cola de poly(A) (PABPN1), RNAs poliadenilados y componentes del sistema ubiquitina-proteasoma. Tales IINs son dinámicas y presentan una gran semejanza ultraestructural y molecular con las IINs de la distrofia muscular oculofaríngea. Sin embargo, mientras que las inclusiones de la OPMD concentran una forma mutada de la PABPN1, las IINs neuronales contienen la forma silvestre de esta proteína, indicando que la agregación nuclear de PABPN1 ocurre en condiciones fisiológicas y que la mutación no es esencial para la formación de IINs.

El objetivo de este estudio es analizar la organización y dinámica de las IINs durante la diferenciación postnatal de las neuronas oxitocinergicas del núcleo supraóptico de la rata, investigando la posible relación entre la formación inicial de las IINs y la maduración de la actividad de síntesis y liberación de oxitocina (OT). Nuestros resultados sobre el nivel de expresión de OT, tanto del mRNA, por Northern blot, como del péptido, por inmunofluorescencia, demuestran un nivel muy bajo durante la primera semana postnatal. Sin embargo, la expresión del mRNA y del péptido se incrementa notablemente en el periodo P14 y alcanza un elevado nivel, similar al de las neuronas maduras, a partir del periodo P21. Las IINs no se detectan durante la primera semana postnatal, coincidiendo con el periodo de baja expresión de OT. Su formación se induce, progresivamente, a partir de la segunda semana, observándose en un 15%, 18% y 33% de las neuronas oxitocinergicas en los periodos postnatales P14, P21 y P30, respectivamente, un incremento que se correlaciona con el aumento en la expresión de OT. Las IINs inicialmente formadas ya contienen todos sus componentes moleculares característicos, tienen un curso arciforme y son de gran longitud, pero se acortan posteriormente para estabilizarse a partir del P30. Nuestros resultados indican que la dinámica de formación de las IINs se relaciona con el nivel de expresión de OT y el reclutamiento de poly(A) RNAs sugiere la participación de estas inclusiones en el procesamiento y exportación al citoplasma de determinados mRNAs.

Financiado por la Fundación Marqués de Valdecilla (IFIMV) de Santander

NEURITOGENESIS Y REORGANIZACIÓN DE LOS CUERPOS NUCLEARES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURON-LIKE DE LAS CELULAS UR61

Joaquín Navascués*, Miguel Lafarga y María T. Berciano

Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander.

Las células UR61 derivan de las células PC12 procedentes del feocromocitoma de rata y poseen una transfección estable del plásmido MMTV unido al oncogén *N-ras* dependiente de dexametasona. El tratamiento de las células UR61 con dexametasona provoca la sobreexpresión de la proteína N-ras que activa una cascada de señalización celular que inhibe la proliferación e induce neuritogenesis y diferenciación catecolaminérgica. La diferenciación celular se acompaña de cambios nucleares asociados al incremento de la transcripción y procesamiento de RNAs.

En este estudio demostramos que el proceso de neuritogénesis se asocia con un incremento del tamaño del soma celular, translocación nuclear de GR, inducción de la expresión de tirosina hidroxilasa y formación y acumulación de gránulos cromafines. Además demostramos que las neuritas en crecimiento acumulan el factor de supervivencia de las neuronas motoras (SMN) y el mRNA de la β -actina..

A nivel nuclear la diferenciación de las células UR61 comporta cambios en el número y composición de los cuerpos de Cajal (CBs) y géminis (cuerpos nucleares enriquecidos en SMN). Así, los CBs de las células indiferenciadas mayoritariamente carecen de SMN, pero, a medida que avanza la diferenciación, se produce un incremento global en la expresión nuclear y citoplasmática de este factor y su reclutamiento en los CBs. Además, la diferenciación “neuron-like” induce la formación y acumulación nuclear de cuerpos géminis. Utilizando técnicas de doble marcaje a nivel de microscopia electrónica demostramos que los géminis representan una categoría diferente de cuerpos nucleares, claramente diferente de los CBs.

Desde un punto de vista funcional la colocalización de SMN y mRNA de la β -actina en las neuritas en crecimiento se relaciona con el papel del SMN en el transporte de mRNAs y sugiere que la traducción del mRNA de la β -actina se produce en los conos de crecimiento. Por su parte, la reorganización de los CBs parece reflejar un proceso de maduración molecular necesario para atender a las mayores demandas de procesamiento de mRNAs nucleares que comporta el proceso de diferenciación.

Becario por la Fundación Marqués de Valdecilla (IFIMV) de Santander.

Análisis proteómico del fluido cerebrospinal embrionario: implicación de la presencia de proteínas relacionadas con la génesis de enfermedades neurodegenerativas.

David Bueno¹, Ángel Gato A.², Carolina Parada¹, Cristina Martín² y Rufo Martín².

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

²Departamento de Anatomía, Facultat de Medicina, Universidad de Valladolid.

Durante el desarrollo embrionario temprano, las células madre neuroectodérmicas del tubo neural se encuentran inmersas en un proceso muy activo de proliferación y neurogénesis, controlado por diversos factores difusibles y de transcripción que actúan coordinadamente. Clásicamente se ha descrito que las moléculas difusibles implicadas en el control de estos procesos, entre ellas factores de crecimiento y morfógenos, son secretadas localmente por el neuroepitelio, especialmente por grupos de células que actúan como centros organizadores, actuando de forma autocrina/paracrina sobre las células adyacentes. Sin embargo, recientemente hemos demostrado que el fluido cerebrospinal embrionario (E-CSF), que se encuentra contenido en la cavidad de las vesículas cefálicas en íntimo contacto con las células madre neuroectodérmicas, ejerce un efecto trófico sobre estas células tanto *in vivo* como *in vitro*, promoviendo la supervivencia y la proliferación de las células madre neurales e induciendo neurogénesis, lo que nos ha llevado a sugerir la existencia en este fluido de moléculas señalizadoras extraneurales esenciales para la regulación de estos procesos de desarrollo.

Con el objetivo de identificar dichas moléculas se ha procedido al análisis proteómico del E-CSF de embriones de pollo. Mediante análisis electroforético bidimensional y la aplicación de técnicas de secuenciación de proteínas hemos identificado muchos de los componentes de la fracción proteica del E-CSF. Entre ellos se incluyen proteínas de matriz extracelular, activadores de la vía de MAP quinasa, transportadores de hormonas y proteínas relacionadas con la señalización mediante retinol y sus derivados, lo que está en concordancia con la función trófica ejercida por este fluido embrionario. Es especialmente interesante destacar que la mayoría de las proteínas contenidas en el proteoma del E-CSF también se encuentran en el CSF humano adulto. Además, de acuerdo con la literatura, muchas de estas proteínas están comprometidas en la regulación de procesos de desarrollo durante la embriogénesis, mientras que durante la edad adulta están implicadas en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Esta concordancia entre procesos de desarrollo embrionario y patológicos en adultos sugiere una vía para activar la proliferación y la neurogénesis de las células madre neurales en adultos.

The precise Control of the Fgf8 activity in the mammalian isthmic organizer

Echevarria, D., Belo JA and Martinez S.

Instituto de Neurociencias. Universidad Miguel Hernandez. Alicante.

The pivotal mechanisms that govern the correct patterning and regionalization of the distinct areas of the mammalian CNS are driven by key molecules that emanate from the so called secondary organizers at neural plate and tube stages. FGF8 is the candidate morphogenetic molecule to pattern the mesencephalon and rhombencephalon in the Isthmic organizer (IsO). Recognizable relevance has been given to the intracellular pathways by which *Fgf8* is regulated and modulated. In chick limb bud development a dual mitogen activated protein kinase phosphatase-3 (*Mkp3*), plays a role as a negative feedback modulator of Fgf8 signaling.

We have investigated the role of the *Mkp3* and its functional relationship with the Fgf8 signaling pathway in the mouse IsO using gene transfer micro-electroporation assays and protein-soaked-bead experiments. Here, we demonstrate that *Mkp3*, beyond any other known modulators, has the fastest and strongest negative feedback action on the MAPK/ERK-mediated FGF8 in the mouse neuroepithelium.

The work presented by the authors has been supported by the following European Union Grants: U.E. QLG2-CT-1999-00793; UE QLRT-1999-31556; UE QLRT-1999-31625; QLRT-2000-02310; Spanish Grants: DIGESIC-MEC PM98-0056; FEDER-1FD97-2090; BF12002-02979; the Spanish Multiple Sclerosis Foundation and Generalitat Valenciana CTIDIA/2002/91; Portuguese Grants: POCTI/NSE/ 46420/ 2002 and IGC/ Fundação Calouste Gulbenkian.

***vHnf1* is involved in specification of caudal hindbrain molecular identity in chick**

F. Aragón¹, S. Cereghini², B. Alsina¹, F. Giraldez¹, C. Pujades¹

¹Departament Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, SPAIN

²CNRS UMR7622, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

In the hindbrain region of the Central Nervous System, anteroposterior (AP) regionalisation involves a segmentation process leading to the formation of seven bulges called rhombomeres (r). Rhombomeres constitute cellular compartments where cell intermingling is restricted at rhombomere boundaries. This establishment of lineage-restricted compartments is thought to be required for each segment to maintain a specific pattern of gene expression and thus a distinct AP identity. At the mechanistic level, however, the molecular cues involved in the early subdivision of the hindbrain are not well understood. Recent work in zebrafish has shown a requirement for the homeodomain-containing transcription factor *vhnf1* in specification of rhombomere 5 and 6 (r5+r6) (Sun and Hopkins, *Genes Dev* 15, 3217-29, 2001; Wiellette and Sive, *Development* 130, 3821-3829, 2003). In order to assess the role of *vHnf1* during hindbrain segmentation in chick, *mvHnf1* was ectopically expressed within the hindbrain by means of *in ovo* electroporation. We show here that *vHnf1* functions in two ways to subdivide the caudal hindbrain. First, *vHnf1* promotes r5+r6 identity through *Fgf3* –probably as a direct target of *vHnf1*– activating *MafB* expression. Second, *vHnf1* functions independently regulating *Krox20* expression in a time-dependent manner. With these results, we propose a dual function of *vHnf1* during hindbrain segmentation.

MIDBRAIN AND CEREBELLAR MORPHOGENESIS ARE PRECISELY CONTROLLED BY DOSAGE OF FGF SIGNALING

Martinez S., Echevarria D., Martin G.

Instituto de Neurociencias. UMH-CSIC, Universidad Miguel Hernandez. Alicante.
Department of Anatomy. School of Medicine. University of California San Francisco.
CA.USA.

Mutational analysis in mice has indicated that FGF signaling has distinct functions at different stages of mesencephalic and cerebellar development. At early stages, FGF8 is required to maintain the expression of genes that play a role in patterning the neural tube. Moreover, it is essential for cell survival (Chi et al., 2003). Interestingly, when *Fgf8* expression is modestly reduced rather than eliminated, the rostral-most portion of the midbrain is spared, and appears normal, whereas the remainder of the dorsal midbrain, the isthmus, and cerebellum is absent. Together, these studies highlight the critical importance of precisely controlling FGF signaling during mes/met development. Such control is achieved, at least in part, by the various regulatory elements and pathways that determine the domains and levels of expression of the FGF ligands involved and the receptor tyrosine kinases through which they signal. *Sprouty*, *Sef* and *Mkp3* are members of the Fgf8 synexpression group. These genes act as a feed-back induced negative regulation of FGF signalling. *Spry* was the first such gene to be identified and in mice there are four orthologs, two of which, *Spry1* and *Spry2*, are strongly expressed in the mes/met from early neural plate stages, in cells close to the sources of FGF activity

We have investigated the effects of *Fgf8* reduction and of excess *Sprouty* on mes/met development in the mouse. Our analysis of the midbrain and cerebellar phenotypes obtained when *Fgf8* expression was progressively reduced and when one or two doses of *Spry2*^{GOF} are activated in either wild-type or *Fgf8* null heterozygous embryos, provides strong genetic evidence that precise dosage regulation of FGF signalling controls normal development of mesencephalon and cerebellum.

The work presented by the authors has been supported Spanish Grant: DIGESIC-MEC PM98-0056.

***charlatan*, un nuevo gen implicado en la regulación de los genes proneurales en *Drosophila*.**

Luis M. Escudero, Eva Caminero, Karen L. Schulze, Hugo J. Bellen y **Juan Modolell**.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC y UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, y HHMI, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston TX 77030, USA.

La formación de los órganos sensoriales (macro-, microquetas y otros tipos de sensilas) requiere la expresión en los discos imaginales de los genes *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*) en grupos de células, los grupos proneurales. Una o muy pocas células de cada grupo proneural se especificarán como célula madre de un órgano sensorial (CMOS). Ello requiere la acumulación de suficiente proteína Ac y Sc en este precursor y se consigue mediante una doble regulación de *ac* y *sc*. En primer lugar, una serie de enhancers, cada uno específico para un determinado grupo proneural, responden a un prepatrón combinatorial y dirigen la activación de *ac* y *sc* en cada uno de estos grupos. En segundo lugar, de entre las células de cada grupo que acumulan más proteína Ac y Sc, una de ellas se erige en CMOS al activar un bucle de autoestimulación de *ac* y *sc* y acumular mucha más proteína proneural que sus vecinas. Esto se consigue mediante un segundo tipo de enhancer, específico para la CMOS y que es regulado negativamente por la vía de Notch. La CMOS activa fuertemente esta vía de señalización, inhibe este enhancer en las células vecinas, e impide que éstas también puedan determinarse como precursores sensoriales.

Presentaré datos que muestran la participación en la formación de las CMOS de un nuevo gen, *charlatan* (*chn*), que codifica una proteína de tipo "dedos de Zinc" y que refuerza la acumulación de Ac/Sc en los grupos proneurales formando un bucle de estimulación con *ac/sc*. Así, Ac/Sc activan a *chn* en los grupos proneurales de las macroquetas del disco imaginal de ala. La sobreexpresión de *chn* estimula la expresión de *ac/sc* y la formación de macroquetas, mientras que su falta de función reduce la acumulación de Sc en los grupos proneurales y elimina en parte las macroquetas del notum. Chn aparentemente estimula a *ac/sc* interaccionando físicamente con los enhancers específicos de grupo proneural y aumentando la eficiencia de estos enhancers. Por otro lado, Chn no es un activador de acción generalizada, puesto que los enhancers que responden a él siguen dependiendo de los factores de prepatrón para su actividad; el enhancer específico de las CMOS no responde a Chn; y otros genes proneurales como *atonal* tampoco lo hacen. *chn* es el primer factor de transcripción conocido que actúa reforzando la acumulación de Ac/Sc en los grupos proneurales de las macroquetas. En el sistema nervioso periférico larvario, *chn* parece ser más bien un gen necesario para la correcta diferenciación de las neuronas sensoriales.

Wnt como filtros de ruido molecular durante el desarrollo

Alfonso Martínez Arias

Departamento de Genética, Universidad de Cambridge, Cambridge (Reino Unido)

Los procesos de generación de patrón a nivel multicelular están basados en procesos moleculares sencillos cuya esencia son reacciones químicas. Como cualquier interacción molecular estas reacciones están sujetas a las leyes de la física que les dotan de un componente de ruido: fluctuaciones en la eficiencia de las reacciones. Estudios recientes en bacterias y levaduras de esta variable en el contexto de la expresión génica confirman esta expectativa y demuestran que la expresión de un determinado gen tiene una variabilidad estocástica en una población celular: ruido. Estos estudios indican que cada gen tiene un nivel de ruido definido y han identificado elementos moleculares asociados responsables de este comportamiento. Esta variabilidad es ventajosa para organismos unicelulares pero es una variable que oprime los procesos coordinados a nivel multicelular que se observan durante el desarrollo embrionario en metazoos. En esta ponencia se analizará la importancia del ruido molecular en la expresión génica durante el desarrollo y se discutirá la posibilidad de que existan mecanismos dedicados al control del ruido. Estos mecanismos son diferentes de los ensamblajes moleculares que median los procesos y que están sujetos a las fluctuaciones que generan ruido. Se propondrá que la función de la ruta Wnt es el filtraje de ruido.

Notch regula desarrollo cardíaco en vertebrados

Joaquín Grego¹, José María Pérez Pomares², Angel Raya³, Luis Luna¹, Juan Carlos Izpisua-Belmonte³ y José Luis de la Pompa¹

¹Dept. of Immunology and Oncology, Lab.418.Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Madrid. ²Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga. ³Gene Expression Laboratorios. The Salk Institute for Biological Studies. La Jolla, USA

La mayoría de las enfermedades cardíacas congénitas son debidas a alteraciones en los mecanismos de formación del patrón, crecimiento y maduración del corazón. La vía de señalización de Notch regula la determinación celular en los metazoos y su activación constitutiva inhibe la diferenciación. Durante el desarrollo cardíaco Notch se expresa en el endocardio, un endotelio especializado que forma la capa interna del tubo cardíaco, y que dará lugar a las válvulas cardíacas mediante un proceso de transición epitelio-mesénquima. Por otra parte el normal desarrollo de los ventrículos es crítico para el correcto funcionamiento del corazón, e implica una fase de compactación del miocardio y trabeculación ventricular. Las trabéculas son estructuras esponjosas necesarias para la correcta función de bombeo, y se forman a partir de la interacción entre endocardio y miocardio. Experimentos de falta de función en pez zebra, pollo y ratón indican que Notch es crucial para la formación de las trabéculas. Notch se requiere para la expresión de neuregulina y BMP10, implicadas en la formación de las trabéculas y el septo interventricular. La inhibición de Notch en explantes cardíacos de pollo afecta al proceso de maduración del miocardio. Los mutantes murinos de Notch muestran un defecto en proliferación del miocardio trabecular; fenómeno similar ocurre en embriones de pez cebra en los que se ha inhibido Notch bioquímicamente. Nuestra hipótesis es que Notch establece un territorio de competencia en el endocardio ventricular, coordinando las señales entre endocardio y miocardio implicadas en el proceso de trabeculación. Estos resultados sugieren que las alteraciones en componentes de la vía de Notch en humanos pueden estar implicadas en anomalías cardíacas congénitas.

Gene expression pattern and pathway of precardiac cells from the primitive streak through the localization into the primitive heart tube

Virginio Garcia-Martinez, Carmen Lopez-Sanchez, and Natividad Garcia-Masa.

Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Extremadura, P.O. Box 108, 06080 Badajoz.

In avian embryos, cells from the epiblast and primitive streak invaginate to form mesodermal and endodermal layers and contribute to cardiac development. Cells from the two cranial thirds of the primitive streak, excluding Hensen's node, migrate bilaterally to constitute the heart forming region, two oval areas in the anterior half of the embryo, which extend until the border between the area opaca and the area pellucida, giving rise to both primitive endocardial tubes. Special reference has been done to the cranio-caudal position of the precardiogenic cells: the more cranial precardiogenic cells of the primitive streak form mainly the arterial pole of the primitive cardiac tube, and viceversa, the more caudal precardiogenic cells of the primitive streak would contribute to the sinus venosus of the primitive heart tube. However, whether or not this organization is maintained in the heart forming region is still a controversial aspect.

In the present work, by means of several groups of techniques, combining double transplantations and double microinjections with different fluorescent dyes, double immunocytochemistry and *in situ* hybridization (cNkx-2.5, usmaar, dHAND, BMP-2, GATA 4, GATA 4-5-6, Hex, Cripto, Fgf8, and Pitx 2), we have realized a precise analysis of the gene expression pattern and pathway of precardiac cells from the primitive streak through their final location into the primitive heart tube. Our results show that the cranio-caudal position of the cells at the level of the primitive streak changes to a medio-lateral position at the level of the heart forming region, involving both the endodermal (which were more cranial in the primitive streak) and the mesodermal (which were more caudal in the primitive streak) layers.

This work was supported by grants nos. 2PR03C029 and 2PR02A042 from PRI (Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología, Junta de Extremadura), and BFU2004-04500/BFI (Ministerio de Educación y Ciencia) from the Spanish government.

Análisis experimental del papel de la señalización por FGFs en la cardiogénesis mediante electroporación *in vitro*

Carmen López-Sánchez¹, María L. López-Gracia², Marian Ros²
y Virginio García-Martínez¹

Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina,
¹Universidad de Extremadura, ²Universidad de Cantabria

Durante las fases iniciales del proceso de gastrulación en aves, las células de la línea primitiva, situadas caudales al nódulo de Hensen, van a constituir a ambos lados del mesodermo anterior la región destinada a la formación del corazón, que dará origen a ambos tubos endocárdicos primitivos. Diversos estudios previos han puesto de manifiesto el importante papel que juega en este proceso de cardiogénesis la señalización por FGFs, proteínas secretadas a nivel del endodermo anterior y nódulo de Hensen, capaces de inducir la expresión de genes específicos a nivel de las áreas precardiogénicas; además, es bien conocido que estas proteínas administradas experimentalmente tienen capacidad de inducir la expresión de los mismos en localizaciones no precardiogénicas.

Con el objeto de analizar con mayor precisión el papel de la señalización por FGFs en el desarrollo inicial del corazón, hemos realizado ensayos de sobre-expresión de dos miembros de la familia, FGF4 y FGF8, en las células precardiogénicas mediante electroporación, llevada a cabo sobre la línea primitiva en las fases iniciales de la gastrulación en embriones de pollo en cultivo. Hemos monitorizado la efectividad del procedimiento mediante la fluorescencia derivada de la co-electroporación del vector PCAGGs-EGFP. Los embriones fueron posteriormente analizados en fase de formación de ambos tubos endocárdicos primitivos, precisando su morfología y la expresión de diversos marcadores cardíacos. Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de FGFs en las células precardiogénicas causa una expansión caudal de los tubos endocárdicos, concomitante con un aumento de la proliferación celular. En conjunto, nuestros resultados sugieren una participación activa de FGF4 y FGF8 durante la cardiogénesis, lo cual es discutido en el contexto del conocimiento actual sobre los mecanismos que controlan este proceso.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-04500/BFI; BFI2002-02946) y la Junta de Extremadura (2PR03C029 y 2PR02A042).

BMP10 ES ESENCIAL PARA EL CORRECTO DESARROLLO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL DEL CORAZÓN EMBRIONARIO

Lourdes Acosta, Hanying Cheng*, Maria del Pilar de Castro, Weinian Shou* y Diego Franco

Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, *Herman B Wells Center for Pediatric Research, Departments of Pediatrics, Indiana University School of Medicine, Indianápolis. EEUU.

Durante la cardiogenesis, distintos miembros de la familia de los BMP (bone morphogenetic protein) se expresan en el corazón. BMP2 y BMP4 se expresan principalmente en los cojines endocárdicos mientras BMP6, BMP7 y BMP10 se expresan en el miocardio. BMP10 se expresa de forma dinámica durante el desarrollo, estando su primera expresión restringida al miocardio trabeculado ventricular y posteriormente se expresa en el miocardio atrial. Para empezar a entender cual es el papel funcional de BMP10 durante el desarrollo cardiaco, se generaron mutantes nulos en el ratón. La ausencia de esta citoquina conlleva a una letalidad embrionaria (E9.5), caracterizada por un decremento significativo en la frecuencia de contracción cardiaca así como por la ausencia de trabeculación ventricular. El estudio de la expresión de distintos marcadores moleculares miocárdicos nos ha permitido discernir que Nkx2.5 y MEF2C, factores de transcripción esenciales para el desarrollo cardiaco, están fuertemente decrementados en los mutantes BMP10 nulos a partir del estadio E9.5. Sin embargo, la expresión de distintas isoformas de miosinas de cadena ligera no están alteradas (MLC2a y MLC2v). Estudios de rescate han permitido saber que la modulación de la expresión de MEF2C y Nkx2.5 solo se reestablece con medio de cultivo condicionado por BMP10, pero no por otras citoquinas (BMP2,4,6,7). El análisis molecular de los reguladores de las distintas corrientes iónicas del potencial de acción cardiaco, han permitido observar que tan solo el canal Herg (KCNH2) está disminuido en los embriones BMP10 nulos. Esta observación es compatible con la disminución en la frecuencia de contracción cardiaca observada en estos mutantes. Análisis *in silico* de la región promotora del gen KCNH2 (rVISTA) ha permitido identificar dos regiones altamente conservadas que tienen múltiples sitios de unión para los factores de transcripción Smads. Estos datos refuerzan la idea de que BMP10 regula la expresión de KCNH2.

A novel model of cardiomyopathy in neonatal piglets uncovers essential insights of the fetal cardiogenic genes into heart postnatal maturation and heart disease

Mario Torrado, Beatriz Nespereira and Alexander T. Mikhailov*

Developmental Biology Unit, Institute of Health Sciences, University of La Coruña, La Coruña, Spain

Heart development is controlled by combinatorial interactions among cardiogenic transcription factors. The capacity of these factors to regulate cardiac gene expression might provide novel entry point for therapeutic control of heart failure. To study re-expression of the fetal cardiogenic factors during postnatal development and at heart failure, a model of experimentally controlled cardiomyopathic propagation in neonatal piglets was developed. Moderate-to-severe cardiomyopathy (CM) was induced in piglets by injections of increasing doses of antitumor cardiotoxic agent, Doxorubicin (Dox). Comparative expression analyses of myocardial biopsies taken from normal and Dox-treated piglets identified, among up-regulated genes, two fetal cardiogenic factors: Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP) and Myocardin (Myo). Molecular profiling of CARP (a negative regulator of fetal cardiac gene expression) revealed: (1) augmented CARP mRNA (3-fold change) and protein (7-fold change) levels in the left ventricle compared to the right ventricle of normal piglets, resulting in left vs right asymmetry in CARP expression throughout early postnatal development, (2) chamber-dependent asymmetric CARP up-regulation in cardiomyopathic hearts of Dox-treated piglets, positively correlating with the severity of heart dysfunction, (3) abolishment of asymmetric patterns of ventricular CARP expression at heart failure produced by Dox, and (4) augmented CARP mRNA and protein levels in cardiac samples obtained from patients with end-time dilated cardiomyopathy (DCM). Expression analyses of Myo (a positive regulator of fetal cardiac gene expression) demonstrated: (1) chamber-dependent distribution of the Myo transcript in neonatal porcine and adult human heart, (2) augmentation of the Myo transcript in the pig and human heart during early postnatal development, and (3) significant Myo up-regulation (5-fold change) in the failing myocardium in both porcine Dox-CM and human DCM. We also showed that expression of Homeodomain Only Protein (HOP), an antagonist of Myo activity, is diminished (5-fold change) in human failing myocardium. Altogether, the results implicate CARP, Myo and HOP both in cardiac postnatal maturation and heart disease.

Embryonic retinoic acid coordinates left-right somitogenesis

Jabier Gallego Llamas, Julien Vermot, Valérie Fraulob, Pierre Chambon and Pascal Dollé

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

Somites are segmental epithelial structures that develop sequentially within the presomitic mesoderm (PSM) during elongation of the embryonic AP axis. Somite development is thought to be governed by a ‘clock and wavefront’ mechanism, in which a molecular ‘oscillator’ depending on Notch and Wnt signalling pathways (the segmentation clock) generates waves of gene expression along the PSM, whereas a maturation wavefront mediated by FGF signalling (in particular via a *Fgf8* mRNA gradient) sweeps back through this tissue, arresting the oscillations and initiating somite differentiation. In addition RALDH2, one of the retinoic acid (RA) synthesizing enzyme, is expressed in this region and the analysis of the *Raldh2* mutant embryos reveals abnormal small somites, suggesting a role of RA in somite formation. The present study was thus designed to better characterize this activity of RA during mouse somitogenesis. In a preliminary study using an in vivo RA-reporter transgene (RARE-Hsp68-LacZ), we found that RA signaling progresses along with somitogenesis as a moving front within the rostral PSM until the level of the prospective 11th somites, which corresponds to the cervico-thoracic transition in the mouse, a region known to be sensitive to a deficiency of RA. Lack of RALDH2 results in an asymmetric progression of somite formation along the left and right PSM, associated to a loss of coordination of the segmentation clock (as visualised with *Uncx4.1*, *Lfng* and *Hes7* expression patterns) and to an asymmetric distribution of the *Fgf8* mRNA gradient between the 8 and 11-13 somite-stages. It thus seems that coordinated somitogenesis requires RA signalling in order to synchronize symmetrically the ticking of the segmentation clock between the left and right PSM.

Búsqueda de genes implicados en el desarrollo y diferenciación de las venas del ala de *Drosophila melanogaster*

Cristina Molnar y Jose F. de Celis

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Universidad Autónoma de Madrid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

La formación de las venas del ala de *Drosophila melanogaster* requiere la actividad de las vías de señalización Notch, EGFR y TGF β . Con el fin de identificar nuevos elementos implicados en estas rutas, así como entender sus interacciones funcionales, hemos realizado una búsqueda de genes implicados en la formación del patrón de venas mediante una mutagénesis de ganancia de función. Para ello hemos generado unas 12.000 inserciones P-UAS, y hemos seleccionado aquellas que, en combinación con una línea Gal4 que se expresa en las venas durante el desarrollo pupal (*shv-Gal4*), producen fenotipos en el ala. Las líneas P-UAS seleccionadas fueron mapeadas molecularmente e identifican unos 300 genes entre los que se incluyen el 70% de los miembros conocidos de las vías de señalización Notch, EGFR y TGF β . La naturaleza molecular de los genes identificados y los fenotipos resultantes tras su sobreexpresión permiten clasificarlos en clases funcionales relacionadas con las rutas de señalización implicadas en la formación de las venas. Como ejemplo de los nuevos genes identificados se expondrá el análisis funcional de un nuevo miembro de la ruta del EGFR.

Odd genes induce retinal differentiation initiation through the activation of hedgehog

C Bras-Pereira*, J Bessa* & [F Casares](#)

CABD, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, Sevilla &

IBMC, Universidade do Porto, Oporto.

(* contributed equally to this work)

In *Drosophila*, the eye derives from a flat sac of larval epithelial cells, called *eye disc*. During larval development, the internal domain of the disc is specified as prospective eye, while its margin will form the surrounding head capsule of the adult fly. Just prior to the initiation of retinal differentiation, the signaling molecule hedgehog (hh) is expressed at the posterior disc's margin and triggers retinal differentiation in the adjacent, eye-competent cells. Here we show that members of the *odd-skipped* (*odd*) family of Zn-finger transcription factors are specifically expressed at the disc's margin and required there for hh expression and, therefore, for eye development; even more, forcing odd expression in the eye-competent domain of the disc induces hh expression and ectopic retinal differentiation. The specific expression of Odd at the margin, together with the early onset of its expression, prompted us to examine the developmental potential of the odd-expressing cells by following their lineage during the development of the eye disc. The great majority of cells from the odd-lineage populated almost exclusively the margin of the disc, giving rise to isolated eye cells only in rare occasions. These results indicate that, at least as soon as odd expression starts, the developing disc is already subdivided into two domains with different developmental potential, the eye primordium and the abutting margin, which derive from almost separate lineages. Odd genes, by being expressed at the margin of the disc, would activate the localized transcription of hh and thus generate the inductive signal that initiates retinal differentiation. One of the functional consequences from the compartmental-like organization we found in the eye disc, the segregation of cells into different territories, might be used during eye disc development for the segregation of eye and head capsule cells into adjacent, but separate organs.

SFRP1 ACTUA COMO MOLECULA DE GUÍA AXONAL PARA LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

Josana Rodríguez¹, José María Ruiz¹, Pilar Esteve¹, Christine Weint², Françoise Trousse¹, Christine Holt² y Paola Bovolenta¹

¹Departamento de Neurobiología del Desarrollo, Instituto Cajal, CSIC, Dr. Arce 37, Madrid 28002, España. ²Dept. Anatomy, Cambridge University, Downing Street; University of Cambridge, Cambridge CB2 3DY, UK

Las Secreted Frizzled Related Proteins (SFRPs) pertenecen a una familia de moléculas secretables que presentan una alta homología con el dominio extracelular de los Frizzled, receptores de las proteínas Wnt. Varios estudios funcionales en vertebrados han demostrado que las SFRPs actúan como antagonistas extracelulares de las vías de señalización de Wnt y están, por lo tanto, implicadas en varias etapas del desarrollo embrionario, incluyendo el establecimiento del eje antero-posterior y la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. Además hay evidencias que las SFRPs pueden actuar de forma independiente de Wnt (rev. in Kawano and Kypta, 2003). En este contexto, estudios anteriores de nuestro laboratorio han demostrado que, en pollo, Sfrp1, un miembro de esta familia, contribuye a la neurogénesis de la retina favoreciendo la formación de las células ganglionares (RGCs) y de los fotorreceptores con un mecanismo que puede ser independiente de la vía de señalización de Wnt (Esteve et. al., 2003)

Aquí demostraremos que SFRP1 es capaz de promover directamente el crecimiento de las neuritas y orientar el movimiento de los conos de crecimiento de las RGCs, actuando por lo tanto como molécula de guía axonal. Esta actividad depende de la concentración intracelular de cAMP y cGMP, mediadores de la función de la mayoría de las moléculas implicadas en guía axonal (Song and Poo, 2001). Como otras moléculas de guía axonal, la función de SFRP1 requiere de síntesis y degradación de proteínas y está modulada por moléculas de la matriz extracelular. Experimentos dirigidos a caracterizar un posible receptor para la actividad de SFRP1, demuestran que la toxina pertúsica, un inhibidor de los receptores acoplados a proteínas G, es capaz de suprimir el crecimiento de las neuritas mediado por SFRP 1, aunque no interfiere en el crecimiento basal de las RGC en cultivos control.

Estos resultados demuestran una nueva función para SFRP1 y indican que la actividad neuritogénica de SFRP1 puede estar mediada, de forma independiente de Wnt, por un receptor acoplado a proteína G. Puesto que en pollo, Sfrp1 se expresa en puntos clave a lo largo de la trayectoria de los axones de las RGCs (disco óptico, quiasma y tracto óptico), pensamos que esta molécula contribuya in vivo a guiar los conos de crecimiento de las RGCs hasta sus dianas.

Esteve, P., Trousse, F. Rodríguez, J. y Bovolenta, P. (2003). SFRP1 modulates retina cell differentiation through a β catenin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* 116, 2471-2481

Kawano, Y. and Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-34

Song, H. and Poo, MM (2001) The cell biology of neuronal navigation, *Nat. Cell Biol.* 3, 81-88.

Early regionalization in the inner ear: involvement of Notch pathway

Gina Abelló, Fernando Giráldez , Berta Alsina.

Biologia del Desenvolupament, DCEXS, UPF, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona.

The inner ear is a sensory organ responsible for hearing and balance. It derives from an ectodermal thickening, the otic placode, adjacent to the hindbrain. During inner ear development, morphogenesis and cell fate specification have to be coupled in order to generate different cell types at the correct space and time. It has been proposed a model based on the segregation into separate compartments as an underlying mechanism for pattern formation in the inner ear (Brigande et al., 2000). However, direct evidence of separate compartments has not fully been assessed.

At otic placode stage, two distinct expression domains can be observed. *FGF10*, *Delta1*, *Lunatic Fringe* and *Hes5* are expressed in an anterior domain (Alsina et al., 2004), while *Lmx1*, *Hairy1*, *Serrate1* and *HNK1* are detected in the posterior domain. To elucidate if early regionalization is accompanied by restriction in cell mixing, we have performed cell labelling experiments with vital dyes. Here we show that, as the otic placode grows and invaginates to form the otic cup/vesicle, cell growth takes place in the meridional plane and DiI and DiO stained clones showed restricted lateral cell mixing. The intersection of DiI/DiO staining was coupled to the complementary limit of *FGF10/Hairy1* expression as revealed by staining of DiI and *in situ* hybridisation with *FGF10* or *Hairy1*. Our data indicates that true compartments are established segregating the otic placode into two initial compartments: an anterior compartment with neuro-sensory properties and a posterior compartment.

In several systems, the establishment of differential compartments and boundary formation involves Notch signalling and the differential expression of the modulator *LFng* in adjacent compartments. In the otic placode, Notch pathway components are regionally expressed. In order to address if Notch pathway is involved in the establishment of the otic compartments, we have performed experiments suppressing the Notch pathway with the inhibitor DAPT. Experiments showed that, Notch is necessary to restrict the expression of *Lmx1* and *Ser1* in the posterior compartment in embryos cultured with DAPT at 9 HH, but not in later stages. This observations suggests that Notch pathway could be involved in the establishment of the otic compartments but not in the maintenance of them.

dSki, un nuevo factor implicado en la vía de señalización de TGF- β en *Drosophila melanogaster*.

Rosa Barrio, Ana López, José F. de Celis

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid.

Los procesos biológicos necesarios para la formación de un individuo adulto, como son crecimiento, diferenciación y apoptosis están regulados por vías de señalización conservadas entre *Drosophila* y vertebrados. La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β) engloba a citocinas cuyos ortólogos en *Drosophila* son Decapentaplegic (Dpp), Glass bottom boat, 60A y Activina. Describimos aquí la caracterización molecular y funcional de dSki en *Drosophila melanogaster*, mostrando que actúa como un regulador negativo de las vías de Dpp y Activina. El gen *dski* produce, mediante splicing alternativo, dos transcritos que se diferencian en su extremo 5' *dski-short* y *dski-long*. Ambos están conservados en *D. pseudoobscura* y en *Anopheles*, y su expresión en discos imaginales de *Drosophila* es ubicua. La sobre-expresión de *dski-short* produce fenotipos característicos de la falta de función de la ruta de señalización de Dpp, tales como reducción del crecimiento del ala y alteraciones en el patrón de las venas. En los correspondientes discos imaginales, la expresión de genes regulados por la vía de Dpp, tales como *spalt*, *optomotor blind*, *brinker* o *thick vein*, se encuentra alterada. De manera análoga, la falta de función de *dski* produce mayor crecimiento del ala, un fenotipo comparable al que se produce mediante la sobre-expresión de Dpp. Por último, *dski* interacciona genéticamente con los efectores de las vías de Dpp y Activina Mad, Medea y dSmad2, posiblemente debido a su capacidad de interacción con las proteínas Smad. El conjunto de estos datos indica la conservación funcional de la familia de proteínas Ski/Sno entre *Drosophila* y vertebrados.

Especificación de los linajes celulares y pancreáticos

Pedro Herrera

Universidad de Ginebra

The Mammalian pancreas is both an exocrine and endocrine gland. The endocrine function is the task of clusters of cells so-called 'islets of Langerhans', which are mainly composed of cells making insulin. Considerable knowledge on the ontogeny of the endocrine pancreas has been gained in recent years, mainly through the use of two complementary genetic approaches in transgenic mice: gene inactivation or over-expression (to assess gene function), and genetic labeling of precursor cells (to determine cell lineages). Understanding pancreatic cell lineages is highly relevant for future cell replacement therapies in diabetic patients, whether from embryonic or adult stem cells, helping to define the identity of putative (endodermal) pancreatic progenitors. In vivo Cre/loxP-based direct cell tracing experiments show that early pancreas and islet progenitor cells can be identified by their sequential expression of certain genes encoding transcription factors. Lineage analyses thus allow the identification of progenitor cells from which mature cell types differentiate, whether during development or in the adult. Once identified, such progenitors can be labeled, isolated, and their differentiation and gene expression profiles studied in vitro and in clonogenic assays in vivo. One of the major goals of our research at this time is to determine the origin(s) of insulin-producing cells, during development and in adult mice, during normal islet cell turnover or after massive injury. In normal postnatal conditions, and more after pancreatic lesion, there is formation of new adult insulin-producing cells. Whether this process results solely from cell proliferation, as recently suggested, needs further exploration. Other possible sources of new insulin-producing cells, which cannot be totally excluded at present, are undifferentiated precursors or even mature cell types, whether pancreatic or extra-pancreatic.

LA SANGRE COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS

José A. Andrades, Silvia Claros, Christopher Murphy*, Ravinder N. Maini*, José Becerra
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, *Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College London.

La regeneración tisular es un proceso complejo que supone la culminación del trabajo de una gran variedad de células que, o estaban presentes o han sido reclutadas en el sitio de la lesión. Estos procesos son guiados por interacciones entre factores de crecimiento (FCs), citoquinas, células y componentes de la matriz extracelular.

Nuestra línea de investigación trata del aislamiento, amplificación e inducción de células madre mesenquimáticas (MSCs, *mesenchymal stem cells*) de la médula ósea (MO) hacia la diferenciación osteogénica. Hasta ahora, hemos utilizado un sistema experimental original de cultivo tridimensional *in vitro* en geles de colágeno, donde se aplican FCs recombinantes, los cuales incorporan un dominio de unión específico al colágeno tipo I. Con esta modificación en los factores se aumenta su vida media, se los puede dirigir a una localización concreta y puede controlarse su biodisponibilidad para actuar sobre las células diana (Gordon y cols. 1997, Han y cols. 1997, Andrades y cols. 1999). Por tanto, con este sistema de cultivo podemos, de una población heterogénea de células de MO, seleccionar, amplificar e inducir células precursoras osteogénicas de forma altamente eficiente (Andrades y cols. 2001, 2002, 2003). Las células así procesadas son susceptibles de ser implantadas en lesiones esqueléticas, donde siguen su proceso de diferenciación, y son capaces de contribuir a la reparación de las mismas (Becerra y cols., en evaluación).

Puesto que la extracción de MO supone siempre una operación quirúrgica no exenta de riesgos, nos proponemos la búsqueda de fuentes alternativas de células madre del adulto que resulten de mejor accesibilidad y menor morbilidad. Esta posibilidad está encontrando respuestas en hallazgos recientes que indican la existencia real de una célula madre común a los linajes hematopoyético y mesenquimático (Pittinger y cols. 1999, Horwitz y cols. 1999, Huss 2000). Por otro lado, se piensa que precursores CD34⁻, que pueden encontrarse en la MO, en la sangre periférica (SP) y, más fácilmente, en la sangre de cordón umbilical del recién nacido, parecen ser precursores de las CD34⁺, que originarían los linajes hemáticos (Campagnoli y cols. 2001), y de las MSCs, capaces de dar, en el ambiente tisular adecuado y bajo los influjos químicos pertinentes, otros sistemas orgánicos mesenquimáticos como condro-, osteo- y mioblastos, e incluso células endoteliales (Pittinger y cols. 1999, Horwitz y cols. 1999, Makino y cols. 1999, Ziegler y cols. 1999, Murohara 2001).

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos a través de un sistema de elutriación para la separación fraccionada automática y en esterilidad de los tipos celulares de la SP, donde se incluye una fracción celular (séptima u octava, según los casos) rica en células precursoras mesenquimáticas que, en el ambiente de cultivo adecuado, expresan marcadores de diferenciación mesenquimática y osteogénica. Esta metodología supone un avance importante para iniciar nuestro sistema de cultivo con células de tipología más concreta que la procedente del crudo de MO, utilizada hasta ahora por nosotros.

Trabajo financiado por el FIS (PI021758), MCYT (SAF2002-2183) y Junta de Andalucía (CVI/0217).

Identification of gene targets of *Drosophila* female stem cell niche signalling – a microarray approach

John Pearson and Acaimo Gonzalez-Reyes

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

Maintenance of germline stem cells (GSC) in *Drosophila* depends upon interactions between somatic and germline stem cells to form a stem cell permissive environment or niche. In common with many other stem cell niches, the *Drosophila* female stem cells niche is characterised by asymmetrical divisions, involving a specialised sub-cellular structure known as a spectrosome. Despite their specialised morphology and divisions, no genes expressed in stem cells in response to niche signalling have yet been described. Isolating sufficient quantities germline stem cell RNA for microarray analysis has been prohibitive because each niche contains only 3-4 stem cells and each cell is closely associated with differentiated cells. To overcome these problems we have isolated RNA from ovaries expressing an activated receptor of the Decapentaplegic pathway, Thickveins (Tkv), which completely blocks germline stem cells differentiation. In addition, amplification was performed on both experimental RNA and control RNA (from wild-type ovaries) prior to hybridisation. Results from four independent microarray replicates exhibit a high degree of consistency despite relatively small amounts of starting material. Among the genes consistently underexpressed in GSC enriched samples are several genes known to be involved in the later stages of oogenesis (e.g. *oskar*) supporting the validity of our experimental methodology and statistical analysis. Several candidate genes strongly overexpressed in the GSC enriched samples have been identified including genes involved in cell-cell signalling, cytoskeletal organisation and the extracellular matrix. Efforts are currently underway to validate the expression of candidate genes *in vivo* using RT-PCR and *in situ* hybridisation. In addition we are developing methods to characterise the role of candidate genes in regulating stem cell divisions by following spectrosome dynamics *in vivo*.

Neuroepithelial stem cells behaviour regulation in chick embryos.

Gato A.¹, Alonso M.I.¹, Moro J.A.¹, Callejo S.¹, Mateo R.¹, Parada C.², Bueno D.², Martín C.¹.

¹Departamento de Anatomía y Radiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

²Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

During early stages of brain development, neuroepithelial stem cells undergo an intense process of cell proliferation and neurogenesis. Several works, mostly performed in vitro, have demonstrated the action of different growth factors in the regulation of these processes, but there are just few evidences of their role in vivo. One of the only known factors that alone can drive neural precursor proliferation and differentiation in vitro is FGF2, which has been suggested to have an autocrine/paracrine way of action. Here we show that FGF2 is present within chick embryonic cerebrospinal fluid, which has been recently reported to have a role on the behaviour of the neuroepithelial stem cells. By in situ hybridisation and PCR analysis we have detected high levels of FGF2 mRNA expression at distinct different embryonic extraneural structures structures as the notochord, the mesonephros and the hepatic anlagen, and low levels of expression at distinct different regions of the neuroepithelium. We demonstrate that FGF2 is transported from the embryonic serum to the cerebrospinal fluid, although we can not discard that it may be secreted at least partially from the neuroepithelium to this fluid. Moreover, the selective immunodeprivation of the FGF2 present in the embryonic cerebrospinal fluid provokes a significant decrease on neuroepithelial stem cells proliferation and neurogenesis. Our results (1) clearly show that FGF2 contained within the embryonic cerebrospinal fluid has a direct role on the control of the neuroepithelial stem cells behaviour; (2) corroborate the important role of the embryonic cerebrospinal fluid on early developmental stages of the central nervous system; and (3) suggest a different way of action for this molecule, directly from the cerebrospinal fluid.

El gen supresor del tumor de Wilms (*Wt1*) está implicado en el desarrollo visceral mediante el control de la diferenciación de las células derivadas del epitelio celómico

¹Muñoz-Chápuli, R., ¹González-Iriarte, M., ¹Carmona, R., ¹Guadix, J.A., Pérez-Pomares, J.M., ²Ijpenberg, A., ²Hastie, N.D.

¹Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga, y ²MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh (United Kingdom)

El gen *Wt1* codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo de diferentes órganos y en tumorigénesis. En el desarrollo normal *Wt1* se expresa transitoriamente en tejidos mesodérmicos, concretamente en epitelio celómico y células subyacentes, meso y metanefros, gónadas y adrenales. La deficiencia en *Wt1* es letal en embriones de ratón, probablemente debido a una insuficiencia cardíaca que causa la muerte entre los días 13 y 15 del desarrollo. Sin embargo, la expresión cardíaca de *Wt1* está restringida al epicardio y a las células derivadas del epicardio (CDEP).

Hemos analizado el desarrollo del celoma y el destino de las células derivadas del epitelio celómico, incluyendo las CDEP, en ratones deficientes en *Wt1* así como en ratones transgénicos *Wt1/LacZ*. Hemos observado que el epicardio y CDEP de los ratones *Wt1*^{-/-} muestran una expresión reducida de RALDH2, PDGFR β y el marcador de proliferación PCNA. Por el contrario, existe una expresión anormalmente elevada de α -actina específica de músculo liso en el epicardio, en las CDEP e incluso en el hígado. Las cavidades celómicas de los ratones *Wt1*^{-/-} son anormales, con cavidades pleurales ectópicas y ausencia de septos pleuropericárdicos y pleuroperitoneales. El hígado muestra un tamaño reducido, con ausencia del lóbulo izquierdo, y el estómago presenta una malrotación y una posición anómala del saco omental. En ratones *Wt1/LacZ* se comprueba que la expresión de *Wt1* en células derivadas del epitelio celómico colocaliza con el marcador de proliferación PCNA.

Estos resultados, en su conjunto, sugieren que *Wt1* mantiene las células derivadas del epitelio celómico en un estado proliferativo y reprime su diferenciación, controlando de esta forma no sólo la forma y el tamaño de las cavidades celómicas, sino también el tamaño de una población de células derivadas del epitelio celómico que contribuye a la vascularización y probablemente también a la morfogénesis de diferentes órganos.

cabut* codifica un factor de transcripción tipo C₂H₂ requerido durante el proceso de cierre dorsal en *Drosophila

Silvia Muñoz-Descalzo y Nuria Paricio

Departamento de Genética, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, E-46100 Burjassot

El cierre dorsal es el último movimiento morfogenético que se produce durante la embriogénesis de *Drosophila*. Al comienzo del cierre, el embrión de *Drosophila* tiene un agujero en la parte más dorsal ocupado por la amnioserosa. Durante el cierre dorsal, los epitelios laterales de cada lado del embrión migran dorsalmente y se fusionan en la parte dorsal. Diferentes estudios han demostrado que este proceso requiere cambios en la forma celular de la amnioserosa y epidermis, la polarización plana de las células más dorsales, asociada con una reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de la ruta JNK en las células del *leading edge*.

En nuestro laboratorio hemos aislado *cabut*, un nuevo gen de *Drosophila* implicado en el cierre dorsal. *cabut* codifica para un factor de transcripción con tres dominios de dedos de zinc tipo C₂H₂. El análisis fenotípico de embriones mutantes de *cabut* muestra que mueren antes de concluir la embriogénesis y con agujeros en la parte anterior-dorsal. Examinando la causa de los defectos de cierre observados en los mutantes hemos encontrado que la polarización y elongación de las células epiteliales más dorsales está afectada, así como la activación de la ruta JNK en las células del *leading edge*. Nuestros resultados indican que este gen actúa por debajo de la ruta JNK regulando la expresión de *dpp*.

***Tbx5*, *Tbx4* y *Pitx1*: crecimiento o identidad de las extremidades de vertebrados**

Carolina Minguillón, Jo Del Buono and Malcolm Logan

Division of Developmental Biology, National Institute for Medical Research
The Ridgeway, Mill Hill
London NW7 1AA, UK

La mayoría de factores requeridos para el correcto desarrollo de las extremidades de vertebrados, se expresan en patrones idénticos en esbozos de patas delanteras (*forelimbs*) y traseras (*hindlimbs*). Sin embargo, las estructuras a las que darán lugar (e.g. brazos *versus* piernas en humanos o alas *versus* patas en pollo) son morfológicamente distintas. Nosotros estamos interesados en entender la base molecular de ésta respuesta diferencial de células en el esbozo de las extremidades delanteras y traseras a vías de señalización comunes, y en identificar algunos de los factores que puedan explicar éstas diferencias morfológicas.

Hasta la fecha, se han identificado muy pocos genes que se expresen diferencialmente en extremidades delanteras o traseras. Entre ellos, dos factores de transcripción de la familia T-box, *Tbx5* y *Tbx4* se expresan exclusivamente durante el desarrollo de pata delantera o trasera, respectivamente. Un factor de transcripción con homeodominio del tipo *paired*, *Pitx1*, se expresa exclusivamente durante el desarrollo de la pata trasera. Experimentos de expresión ectópica en pollo, relacionaron a estos factores (*Tbx5*, *Tbx4* y *Pitx1*) en la especificación del tipo de pata (delantera *versus* trasera). Por otro lado, experimentos de delección en ratón, evidenciaron un papel para los mismos genes en la iniciación del crecimiento de la extremidad.

Con el uso de tecnología Cre/lox en combinación con métodos de transgénesis en ratón, hemos desarrollado un ensayo al que llamamos ensayo de rescate de la pata. En este ensayo, disrupcionamos condicionalmente la función de *Tbx5* en la pata delantera en desarrollo y la sustituimos por la de *Tbx4*, *Pitx1* (los putativos factores de especificación de pata trasera) o la de los dos a la vez. Esto nos permite determinar si la función de *Tbx5*, *Tbx4* y *Pitx1* se requiere para la iniciación del crecimiento de la extremidad y/o para la especificación del tipo de extremidad.

Coordination of Chondrocyte Differentiation and Joint Formation by $\alpha 5\beta 1$ Integrin in the Developing Appendicular Skeleton.

David Garciadiego-Cázares¹, Carlos Rosales², Masaru Katoh³ and Jesús Chimal-Monroy¹

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología and ²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

³Genetics and Cell Biology Section, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo

The point of decision by which chondrocytes adopt cell fate among cartilage differentiation program or joint program is unknown. Here we investigated the effect of $\alpha 5\beta 1$ integrin inhibitors and BMP on joint formation. Blocking of $\alpha 5\beta 1$ integrin by specific antibodies or RGD peptide, induced inhibition of pre-hypertrophic chondrocyte differentiation and ectopic joint formation between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Ectopic joint expressed *Wnt14*, *Gdf5*, *Chordin*, *Autotaxin* and type I collagen and CD44, while expression of IHH and type II collagen was down-regulated in cartilage. Expression of these interzone markers confirmed that the new structure is a new joint being formed. In the presence of BMP7, inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrin function still induced the formation of the ectopic joint between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. In contrast, misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin resulted in fusion of joints and formation of pre-hypertrophic chondrocytes. These facts indicate that the decision of which cell fate to make to pre-joint or pre-hypertrophic is made on the basis of the presence or absence of $\alpha 5\beta 1$ integrin on chondrocytes

Cell signalling, morphogenesis and pattern formation during *Drosophila* limb development

Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Bishop S.A., Butler, M. and Couso, J.P.

Following our work on the Proximal-Distal development of the limbs in the fly (1), we have uncovered a putatively new cell signalling event triggered by an unusually short gene product. This cell signal controls gene expression and pattern formation during wing and leg development, and the development of folds in the respective developing primordia, or imaginal discs. The morphogenesis of the imaginal discs has been a neglected area of research but we are realising that the stereotyped appearance of folds is in fact an important part of the distalization process and entails remodelling of the epithelial basement membrane and the extracellular matrix (2). Most interestingly, microarray data has led us to realise that these signalling and morphogenetic events involve a mesenchymal population of cells that grow underneath the imaginal disc epithelium, in a manner similar to vertebrate limbs.

Refs: (1) Galindo, Bishop, Greig and Couso (2002) *Science* 297: 256
(2) Fessler et al. 1993, *Development* 117: 1061

Análisis del mecanismo por el que Shh controla la apoptosis en el desarrollo de la extremidad

M^a Félix Bastida, M^a Dolores Delgado, Marian Fernández-Terán, Marian Ros

Dpto. de Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria

Durante el desarrollo de la extremidad de los vertebrados, la proteína señalizadora Sonic hedgehog (Shh) es secretada por un grupo de células del mesodermo posterior, llamado zona de actividad polarizadora. Shh controla el patrón en el eje anteroposterior y además también está implicada en el control de la apoptosis y proliferación celular de la extremidad en desarrollo, dos procesos que contribuyen de forma significativa al patrón final de la extremidad.

Existen evidencias de que el control de los procesos de muerte celular por Shh tiene lugar de forma diferencial, en función de su posición en el esbozo de extremidad (Sanz-Ezquerro y Tickle, 2000). En efecto, la aplicación ectópica de SHH previene la muerte celular en el mesodermo anterior y medio del esbozo de extremidad, mientras que en el mesodermo posterior la regula positivamente. Nuestro trabajo se centra en el estudio de los mecanismos por los cuales Shh controla la apoptosis de esta forma selectiva.

La señalización de Shh está mediada por los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2 y Gli3). Nosotros hemos investigado la expresión de los genes *Gli* en relación con *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7*, miembros de la superfamilia de los transforming growth factors, implicados en procesos de apoptosis durante el desarrollo de la extremidad. En nuestros experimentos la transcripción de los tres genes *Gli* y los tres *Bmps* mencionados responden de forma diferente a la señalización de Shh. Nuestros resultados indican que Shh previene la muerte celular en el mesodermo anterior de la extremidad a través del control negativo de la expresión de *Bmp4*, mediada por una forma corta represora de Gli3 (Gli3R) (Bastida et al. 2004). Por el contrario, en el mesodermo posterior, Shh regula positivamente la muerte celular induciendo la expresión de *Bmp2* a través de la actividad de Gli1 y probablemente Gli2. El análisis de la expresión de *Bmp4* y *Bmp2* en mutantes de pollo y ratón que presentan alteraciones en la expresión o el procesamiento de las proteínas Gli, avalan nuestra hipótesis.

Sanz-Ezquerro JJ, Tickle C. 2000. Autoregulation of Shh expresión and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development* 127:4811-4823.

Bastida, MF et al. (2004). The levels of Gli3 repressor correlate with *Bmp4* expression and apoptosis during limb development. *Dev. Dyn* 231: 148-160

Mutation of *vhnf1* results in mis-patterning of the otic vesicle in zebrafish

E. Ulloa, V. Lecaudey#, S. Schneider-Maunoury#, C. Pujades

Grup de Biologia del Desenvolupament, DCEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona
#CNRS UMR7622 UPMC, and INSERM 368, Ecole Normale Supérieure, Paris

The inner ear is a complex sensory organ responsible for the senses of hearing, balance and detection of acceleration in vertebrates. Development of inner ear starts with the induction of the otic placode within the surface ectoderm adjacent to the prospective hindbrain, and subsequently will form the otic vesicle. Concomitantly, in the hindbrain region of the vertebrate Central Nervous System, Antero-Posterior regionalisation involves a segmentation process leading to the formation of 7-8 morphological bulges called rhombomeres. Gene inactivation in mice suggested that genes expressed in the neighbouring hindbrain are involved in the control of otic development.

vhnf1 mutants in zebrafish display hindbrain patterning defects and a reduction in size of the otic vesicle. We have examined whether the smaller otic vesicles are due to defects of otic patterning. Here we show that the smaller otic vesicles present an expansion of the anterior markers like *nkx5.1*, *pax5*, and *fgf8* that can include the entire otic epithelium juxtaposed to the hindbrain, whereas the posterior marker *follistatin* is reduced. The ventral marker *eyal* is as well expanded to the expense of *dlx3* dorsal gene. Moreover, this mis-patterning results in a loose of sensory patches visualised by *msxC* expression. These data supports the crucial role of neural tube signals in organisation of the distinct functional regions of the otic vesicle.

This work was supported by grants MCyT I+D BMC2003-07751-CO3-03 to C.P., PICS-CNRS2003 and HT2002-0055 to C.P. and S.S.M.

Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm

Rodriguez Tristan

MRC Clinical Science Centre. Imperial College London. Hammersmith Hospital Campus.
Londres

The anterior visceral endoderm (AVE) is an extra-embryonic tissue required for specifying anterior pattern in the mouse embryo. The AVE is induced at the distal tip of the 5.5dpc embryo and then migrates to the prospective anterior, where it imparts anterior identity upon the underlying epiblast (the tissue which gives rise to the embryo proper). Little is known about how the AVE is induced and what directs its migration. In this paper, we describe an essential role for another extra-embryonic tissue, the extra-embryonic ectoderm (ExE), in patterning the AVE and epiblast. Removal of the ExE in pre-gastrulation embryos leads to ectopic AVE formation, a failure of AVE cell migration, and to the assumption by the entire epiblast of an anterior identity. Ectopic transplantation of ExE cells inhibits AVE formation and leads to an expansion of the posterior epiblast marker *T*. These results demonstrate that the ExE restricts the induction of the AVE to the distal tip of the mouse embryo and is required to initiate the migration of these cells to the prospective anterior. Together, these data reveal a novel role for the ExE in the specification of the anterior-posterior axis of the mouse embryo.

***wingless* regulation in the head primordium of the *Drosophila* eye imaginal disc.**

Paulo S. Pereira¹, S. Pinho², JP Couso³, and F. Casares^{1,2}

¹Developmental Biology Lab, IBMC, Porto, Portugal

²Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Seville.

³School of Biological Sciences, Sussex University, UK

wingless (*wg*), the fly homologue of the mammalian Wnt-1 gene, plays essential roles during the development of the *Drosophila* head structures by controlling the establishment of the dorsal-ventral (DV) and anterior-posterior (AP) axes of the eye disc, the larval primordium of most adult head structures. *wg* is first expressed in dorsal cells of the first and second larval stage eye disc, and induces the expression of the dorsal genes of the Iro complex to set the DV border or Notch activation, essential for further disc's growth. During late second larval stage, dorsal *wg* expression retracts to the anterior margins of eye field, and a new smaller domain appears on its anterior ventral margin; its secreted protein product is required now for the formation of the head capsule and to block photoreceptor differentiation, by preventing retinal initiation and progression. Regulating where and when to transcribe the *wingless* (*wg*) gene is therefore crucial for normal *Drosophila* head development. Insofar, the identification and study of transcriptional regulators of *wg* expression has been hampered by the difficulty of mapping modular tissue-specific enhancers in the large *wg* non-coding regions. Thus, we have identified and mapped an evolutionarily conserved eye-disc specific enhancer of *wg* (WHE) to a short 3' downstream region located several kbs away from the transcription start site. We show that ectopic expression of *Pnr* –a GATA transcription factor previously proposed to set up the DV axis by activating *wg* in the dorsal eye disc– is sufficient to activate the WHE in the eye-disc (but not in the wing disc). Surprisingly, mutation of the two *Pnr*-binding sites in the WHE is not sufficient to completely abolish its enhancer activity. Furthermore, *Pnr* loss-of-function clones in the eye disc retain WHE activity (and *wg* expression) in most part of the *wg* expression domain, suggesting that *Pnr* must cooperate with eye-specific transcriptional regulators to regulate *wg*. In addition, we will further discuss other approaches we are undertaking towards the identification of novel functional binding sites in the WHE sequence, as well as of the transcriptional factors binding these sites, in order to gain further insight into the transcriptional regulation of *wg*.

Estudio funcional de los genes Hox en el desarrollo de los halterios.

L. De Navas¹, M. Suzanne¹, C. Alonso², H. Reed², R. Barrio¹, M. Akam²,
E. Sánchez-Herrero¹.

1) Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, España

2) University Museum of Zoology, Department of Zoology, Cambridge.

Las diferencias entre alas y halterios se establecen por el gen hox *Ultrabithorax (Ubx)*, que se expresa en el halterio y no en el ala. La proteína codificada por el gen *Ubx* presenta distintas isoformas producidas por splicing alternativo según un patrón específico de tejido. En la epidermis embrionaria predomina la isoforma Ia mientras que la isoforma IVa es la predominante en el sistema nervioso central. Hemos estudiado la capacidad de las distintas isoformas de *Ubx* para dirigir el desarrollo del halterio. Nuestros resultados sugieren que la isoforma IVa no es tan eficiente en la formación de este apéndice como la isoforma Ia. El homeodominio de las distintas proteínas hox se une a la misma secuencia de ADN con una afinidad comparable en experimentos “in vitro”. Hemos estudiado también la especificidad funcional de las diferentes proteínas Hox en su capacidad para desarrollar halterios. Algunas de ellas, aparte de *Ubx*, son capaces de desarrollar apéndices mayormente normales, mientras que otras son menos eficientes en este papel. Concluimos por lo tanto que hay varios genes Hox aparte del propio *Ubx* capaces de desarrollar halterios.

Activación génica concertada por el gen Hox Abd-B modula propiedades celulares básicas para inducir la formación de un órgano específico de segmento.

James Castelli-Gair Hombría

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide, 41013 Sevilla

Los genes homeóticos Hox codifican factores de transcripción conservados en vertebrados e invertebrados capaces de organizar en tejidos muy diversos el desarrollo de órganos específicos de segmento. El objetivo de mi investigación es descubrir completamente una de estas cadenas de regulación. Para ello he concentrado mi esfuerzo en analizar como el gen maestro *Abdominal-B* (*Abd-B*) controla la morfogénesis de los espiráculos posteriores de *Drosophila* desde su especificación hasta su diferenciación final. En el curso de este trabajo he descubierto que *Abd-B* activa otros factores de transcripción que controlan reordenamiento celular y elongación celular. Mi trabajo ha demostrado que los genes *grain* (*grn*) (que codifica un factor de transcripción de tipo GATA) y el gen *stat92E* (STAT) juegan un papel fundamental en el control de estos procesos morfogenéticos. Ahora estamos concentrando esfuerzo en identificar los genes controlados por STAT y GRN. Presentaré evidencia sugiriendo que éstos incluyen genes que controlan polaridad celular (como el determinante apical *crumbs*), moléculas de adhesión celular (Cadherinas) y reguladores del esqueleto de actina (RhoGAP).

ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS ORGANISMOS CON SIMETRÍA BILATERAL: DE LA FILOGENIA MOLECULAR A LA EVO-DEVO FUNCIONAL.

Jaume Baguña

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

La evolución del patrón corporal bilateral fue un acontecimiento clave en la evolución animal. No en vano más del 90% de filos y más del 99% de las especies son bilaterales. Para entender cómo surgió tal innovación, seguramente a partir de organismos de simetría radial, es necesario determinar las características básicas de los primeros bilaterales. Hasta no se descubran fósiles con características plesiomórficas (ancestrales) de organismos radiales junto a características apomórficas (derivadas) propias de bilaterales, este empeño parece quimérico. En el ínterin, un primer paso sería determinar el grupo más basal de los bilaterales actuales y el grupo de organismos radiales actuales más cercano a los bilaterales. Seguidamente, podríamos comparar la expresión de genes clave del desarrollo entre ambos grupos. El objetivo final sería establecer homologías entre los ejes Oral-Aboral (OA) de Cnidarios y los ejes anteroposterior (AP) y dorsoventral (DV) de bilaterales, y determinar el origen del mesodermo y del sistema nervioso.

La secuenciación de genes ribosomales y otros genes nucleares, genes mitocondriales, y los datos cualitativos aportados por los genes Hox/ParaHox e inserciones/deleciones específicas, indican que el grupo actual de bilaterales más cercano a la base de los bilaterales son los Platyhelminthes acelomorfos. Al tiempo, la misma fuente de datos sugiere que los Cnidarios Antozoos son el grupo de organismos radiales más cercano a los bilaterales. A partir de colecciones de ESTs o por “screening” directo, diversos laboratorios han clonado y secuenciado genes Hox/ParaHox, genes dorsoventrales, mesodérmicos y neurales, tanto de Antozoos y, en menor grado, de Acelomorfos. Genes ortólogos a los genes AP y DV de bilaterales se expresan en embriones y larvas (plánulas) de Antozoos, aunque no de manera ortogonal. Al tiempo, los genes “mesodérmicos” se expresan en el endodermo. Los datos en acelomorfos son escasos y no permiten aun establecer comparaciones razonables.

Es posible “reproducir” el paso de un organismo de simetría radial a uno con simetría bilateral?. En otras palabras, cómo producir asimetrías en un organismo radial actual que dé lugar a un nuevo eje (sea AP o DV) ortogonal al eje primario (sea DV o AP) transformándose en un bilateral?. Inversamente, cómo “radializar” un bilateral actual?. Aun entrando en terrenos extremadamente hipotéticos y complejos, dos métodos parecen factibles: 1) utilizar la interferencia de RNA (RNAi) inhibiendo asimétricamente la expresión radial de genes que se expresan alrededor del blastoporo en larvas plánula, o inducir la expresión radial de genes de expresión D o V en embriones de acelos; y 2) obtener plánulas transgénicas e inducir la expresión ectópica de genes que inhiban la expresión radial de otros genes. El primer método es operativo en varios laboratorios; el segundo, hoy en día Evo-ficción, se aproxima a lo que Brenner definió como Genética de Síntesis: “producir” nuevos organismos que traten de imitar, muy burdamente desde luego, lo que debió pasar hace 550-600 millones de años.

La complejidad de los vertebrados: más allá de la duplicación génica.

Jordi Garcia-Fernàndez, Elia Benito-Gutiérrez, Josep Gardenyes, Anna Rosanas & Senda Jiménez-Delgado,

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Las teorías actuales sobre la base genética de la transición invertebrados/vertebrados sugieren que fenómenos de duplicación génica a gran escala, llegando a la doble poliploidización, pudieron haber facilitado la invención de características morfológicas complejas. El material genético virgen y redundante tras la duplicación podría haber sido pues substrato para la neofuncionalización de genes y redes génicas clave para el desarrollo embrionario, que a su vez habrían sido la base del incremento en complejidad. El término “complejidad” no es de fácil definición. No obstante, algunas estructuras o sistemas vertebrados sin duda son más “complejos” que sus homólogos en invertebrados. Como ejemplos, aspectos tales como la segmentación del romboencéfalo, el número de neuronas, la diversidad de tipos neuronales, o la capacidad de establecer múltiples conexiones sinápticas simultáneas pero moduladas diferencialmente, sí podrían considerarse características comparativamente complejas. El trabajo de diferentes genes y redes génicas se suma y contribuye a esta complejidad. Genes y redes génicas “conservadas”. Es casi dogma hoy hablar de la conservación evolutiva de genes y redes génicas en organismos tan distantes como la mosca, el nemátodo, o el hombre. Y en cambios en el lugar de expresión o sutiles cambios proteicos como la base de la diversidad y la innovación inherentes al proceso evolutivo. Pero no de la invención de nuevos genes. En nuestro laboratorio investigamos el cefalocordado anfioxo, justo en la frontera invertebrados/vertebrados. Nuestros datos más recientes sugieren que no sólo de la duplicación y co-opción de genes y redes génicas se nutrieron los primeros vertebrados, sino que en algún caso, además, se crearon, probablemente por barajado de exones, nuevos genes, y nuevas redes génicas, capaces de realizar acciones no vistas aún en la evolución animal. Uno de estos genes, o una de estas redes, inventadas en la frontera, pueden muy bien haber sido responsables de que nuestro sistema nervioso sea complejo, y nos haya hecho ser móviles y feroces, como no lo eran nuestro tranquilos, pacientes filtradores, antepasados, tales como el anfioxo.

POSTERS
20 SEPTIEMBRE
SESION A

A1.- A *Drosophila* model to study the molecular mechanisms of E-Cadherin triggered tumorigenesis.

A Teixeira , S Pinho , G Suriano, P Ferreira, R Seruca & F Casares

A2.-Análisis de la función de *dpp* (*decapentaplegic*) en el proceso del cierre dorsal (dorsal closure) en la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

Beatriz García Fernández y António Jacinto

A3- Proliferative control by Wnt signaling during wing hinge formation in *Drosophila melanogaster*.

Marie-Laure Dichtel-Danjoy , Sofia Pinho, and Fernando Casares .

A4.- GH3, un nuevo dominio proapoptótico de Grim, promueve la vía mitocondrial de muerte en *Drosophila* y en células de mamífero.

Cristina Clavería, Eva Caminero, Carlos Martínez-A, Sonsoles Campuzano, Miguel Torres.

A5.- The role of the gene *optomotor blind* in the *Drosophila* wing

Terriente Javier

A6 Relación entre *vestigial* y la información posicional en el ala de *Drosophila*

Baena-López, L. A.; García-Bellido, A.

A7.-Activation and repression activities of *ash2* in *Drosophila* wing imaginal discs

Mireia Angulo, Montserrat Corominas and Florenci Serras

A8.-El papel de los Glipicanos en el tráfico de Wingless

Xavier Franch-Marro, Oriane Marchand, Eugenia Piddini, Sara Ricardo, Cyrille Alexandre and Jean Paul Vincent.

A9.-Finding *ash2* direct target genes by combining *in vivo*, *in vitro* and *in silico* analyses

Sergi Beltran, Enrique Blanco, Florenci Serras, Roderic Guigó and Montserrat Corominas

A-10.- Regulación del factor de transcripción Epiprofina por FGFs y SHH durante el desarrollo embrionario.

Lucía Jiménez, Susana de Vega, Takashi Nakamura, Yoshihiko Yamada, Fernando J. Unda.

A11.- Coexpresión de *pitx2c* y *pitx2b* en corazón embrionario y adulto de ratón.

Hernández-Torres F, Domínguez JN, Martínez S, Navarro F y Aránega AE.

A12.-Transformación neoplásica de las células madre embrionarias *ab1* tras su trasplante en los túbulos seminíferos de animales adultos.

Unai Silván, Alejandro Diez-Torre y Juan Aréchaga.

A13.- Beta catenin expression during vascular development and degeneration of avian mesonephros

V. Nacher, M. Navarro, A. Carretero, C. Armengol, C. Llombart, J. Blasi, J. Ruberte.

A14 Generación y análisis de clones somáticos en el embrión de ratón

Carlos G. Arques, Róisín Doohan, Victoria Campuzano, James Sharpe, Miguel Torres

A15.- Papel de la matriz extracelular del epitelio del borde medial en la génesis de la fisura palatina producida en ausencia de $\text{tgf-}\beta_3$

E. Martínez-Sanz; E. Resel; E. Trinidad; J. Murillo; A. del Río; C. Barrio; J. Valero; C. Izquierdo; ML. Martínez; L. Santiago; C. Martínez-Álvarez

A16.- Miembros de la familia snail y supervivencia celular en la fisura palatina fisiológica y patológica

C. Martínez-Álvarez; R. Pérez; M.J. Blanco; T. Martínez; M. Aparicio; E. Resel; M.A. Rabadán; MA. Nieto.

A17.- Gene-expression profile of epithelial cells upon *Snail* transfection: Targets in the induction of epithelial to mesenchymal transitions

Agnès Boutet and M. Angela Nieto

A18.- Estudio del complejo cadherina/catenina y de la expresión de metaloproteasas en células madre embrionarias

Alejandro Diez-Torre, Unai Silván y Juan Aréchaga

A19.- Morphogenetic movements influence endoderm patterning in zebrafish

Concepción Rojo, Álvaro San Millán, Encina González

A20.- Identificación de un gen reporter de la activación de la ruta jak/stat

Laura Cobreros

A21.-Caracterización funcional del gen Sip1 en *Drosophila* : buscando los *partenaires* de la DMoesina.

Carmen Alvarez, Fernando Roch, Cédric Polesello, Paul Mangeat, Christian Roy, Marianne Martin, François Payre

A22.- INTERACCIÓN ENTRE LA RUTA DE DPP Y LA ACTIVINA

Juanas Melero, David y García-Bellido Antonio

A23.- Neutralization of soluble, foetal, and dam-foreign antigens: anatomical and histological effects

Luis Juárez and Antonio Rodríguez-Burgos

A *Drosophila* model to study the molecular mechanisms of E-Cadherin triggered tumorigenesis.

A Teixeira², S Pinho^{1,2}, G Suriano³, P Ferreira³, R Seruca³ & F Casares^{1,2}

¹ CABD (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo), UPO-CSIC, Sevilla, Spain.

² IBMC, Universidade do Porto, Portugal.

³ IPATIMUP, Universidade do Porto, Portugal.

E-cadherins are transmembrane cell-adhesion molecules involved in cell-junction formation and epithelial integrity maintenance in a Ca-dependent manner. Disruption of the E-cadherin complex leads to loss of cell adhesion and increased motility and the loss of E-cadherin is associated with a number of cancer types including the hereditary diffuse gastric cancer (HDGC), which in 30-40% of the cases harbours germline mutations in the CDH1/ E-cadherin gene. Most mutations are inactivating, leading to truncated proteins, although missense mutations, which give rise to abnormal E-cadherin molecules, have also been identified. Functional assays in mammalian cell cultures reveal that missense E-cadherin variants still retain some biological function. Nevertheless, the molecular mechanisms affected by these mutations are still not known. The lack of in vivo systems where to search for these signalling pathways prompted us to develop a *Drosophila* model system. Despite the evolutionary distance between the *Drosophila* and humans, most molecular and cellular processes are conserved between these organisms. Furthermore, approximately 70% of human disease genes are conserved in *Drosophila*, which makes this a simple but suitable model organism for the study of several human diseases including stomach cancer.

To this aim, we have generated transgenic fly strains with which, using the GAL/UAS system, normal or missense mutant forms of human E-Cadherin can be targeted to *Drosophila* epithelia, and the developmental effects observed compared to those produced by similar expression of the endogenous *Drosophila* E-cadherin homologue. Our results indicate that the human E-Cadherin (and its mutant forms) is produced and localizes to Adherens Junctions in *Drosophila* cells. Furthermore overexpressions of DE-Cadherin or human E-Cadherin induce very similar phenotypes. Using this system we have analysed the molecular effects induced by overexpression of human E-cadherin mutant forms associated with HDGC.

Análisis de la función de *dpp* (*decapentaplegic*) en el proceso del cierre dorsal (dorsal closure) en la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

Beatriz García Fernández y António Jacinto

Instituto Gulbenkian de Ciencia. Oeiras. Portugal

Durante los últimos estadios de la embriogénesis, el embrión de *Drosophila* muestra en la parte dorsal de la epidermis, una discontinuidad. Dicha discontinuidad está cubierta por un epitelio simple de células poliploides denominado amnioserosa (AS). El proceso de dorsal closure (DC) incluye movimientos celulares y cambios en la forma de las células que junto con la contracción de la amnioserosa producen el cierre del epitelio y contribuyen a la formación de la cutícula de la futura larva. Durante DC las células de la amnioserosa mueren por apoptosis. Por otro lado, las células epidérmicas que están en contacto con la amnioserosa, que se denominan leading edge cells (LE) son importantes motores durante este proceso.

Análisis genéticos han demostrado que las vías de señalización Jun N-terminal Kinasa (JNK) y Decapentaplegic (Dpp), un miembro de la familia de factores secretados BMP/TGF- β en *Drosophila*, controlan estos procesos celulares. JNK activa la expresión de *dpp* en las células del LE, sugiriendo que Dpp puede actuar como una señal secretada para coordinar los movimientos tisulares durante DC.

Estudios previos de mutantes en los miembros de la cascada de señalización de *dpp* indican que Dpp es necesario para la elongación de las células laterales de la epidermis.

Nuestros resultados sugieren que la función de la vía de señalización de *dpp* es más compleja y no solo parece afectar las células epidérmicas, sino que distintos datos apuntan a Dpp como un posible regulador de la constricción apical de la AS.

Proliferative control by Wnt signaling during wing hinge formation in *Drosophila melanogaster*.

Marie-Laure Dichtel-Danjoy 1, Sofia Pinho 1,2 and Fernando Casares 1,2.

1- CABD (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo). Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, SPAIN.

2- IBMC (Instituto de Biología Molecular e Celular), Universidade do Porto, PORTUGAL.

The signaling molecule encoded by the wingless (*wg*) gene (the *Drosophila* homologue of the mammalian proto-oncogene Wnt-1) elicits distinct responses in different tissues during the development of the fruit fly. This phenomenon of tissue-specific *wg* action is well exemplified in the wing imaginal disc. This sac of epithelial cells is subdivided into different territories: the central pouch will give rise to the wing, the rim around the wing pouch will form the intermediate hinge, and the most peripheral tissue will develop into the proximal body wall structures (notum and pleura). In the pouch, *wg* induces the expression of the wing selector gene, *vestigial*, acting as a morphogen, and regulates cell proliferation and survival of the future wing cells (1 and 2).

In the prospective hinge formation, though, *wg* controls cell proliferation (3). To analyze the mechanisms by which *wg* controls proliferation in the hinge territory, we are directing the expression of a GFP-tagged version of Wg to the developing hinge (4). This *wg* overproduction, during late larval stages (third instar), leads to a dramatic overgrowth of this territory without any apparent change in cell fate (Instead, *wg* overexpression in the wing pouch leads to a respecification of the pouch's cells as sensory organs). Taking advantage of this *wg*-induced overproliferation we are first analyzing cell cycle specific changes of the overproliferating cells by flow cytometry in order to get insight into the cell cycle checkpoint that might be under *wg* control.

Second, we are testing which genes/pathways are required for *wg* to control hinge cell proliferation. Preliminary results indicate that the expression of an activated form of a downstream effector of the *wg/Wnt* canonical signaling pathway -*armadillo/β-catenin*- does not induce overgrowths, as we would have expected. Therefore, we are now testing whether this pathway is indeed involved in the control of proliferation or rather this control goes through alternative ones instead. Moreover, we are testing if the *homothorax* and *teashirt* transcription factor-encoding genes, which have been previously implicated in *wg*-mediated proliferation in other fly tissues (5), are also recruited during hinge proliferation.

(1) Johnston, L. A. & Sanders, A. L. Wingless promotes cell survival but constrains growth during *Drosophila* wing development. *Nat Cell Biol* **5**, 827-33 (2003).;(2) Giraldez, A. J. & Cohen, S. M. Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**, 6533-43 (2003).;(3) Neumann, C. J. & Cohen, S. M. Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing. *Development* **122**, 1781-9 (1996).;(4) Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15 (1993).;(5) Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F. & Mann, R. S. Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes Dev* **16**, 2415-27 (2002)

GH3, un nuevo dominio proapoptótico de Grim, promueve la vía mitocondrial de muerte en *Drosophila* y en células de mamífero.

Cristina Clavería, Eva Caminero*, Carlos Martínez-A, Sonsoles Campuzano*, Miguel Torres.

Dpto. de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) y *Centro de Biología Molecular (CSIC), Campus Universidad Autónoma, Madrid.

Grim codifica una proteína esencial para la inducción de muerte celular programada en *Drosophila*. Mediante su extremo amino-terminal, interacciona con las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), previniendo su actividad inhibidora de las caspasas. Sin embargo, la delección de esta región no elimina la actividad proapoptótica de Grim. Describimos GH3, un dominio interno de Grim de 15 aminoácidos, necesario para la actividad proapoptótica de Grim y capaz de inducir muerte celular fusionado a una proteína portadora heteróloga. Las proteínas proapoptóticas de *Drosophila* Reaper y Sickie contienen una región homóloga al dominio GH3. Durante la inducción de apoptosis, Grim colocaliza con las mitocondrias y el citocromo c, de forma dependiente del dominio GH3, e independiente del dominio amino-terminal y de la actividad de las caspasas. Al sobreexpresar Grim *in vivo*, ambos dominios, amino-terminal y GH3, son necesarios y cooperan en la inducción de apoptosis. Los dominios amino-terminal y GH3 de Grim activan vías apoptóticas independientes que de forma sinérgica inducen muerte celular programada.

Hasta el momento no se han identificado genes homólogos a *grim* en ninguna otra especie. Sin embargo, Grim induce apoptosis en células de mamífero activando específicamente la vía mitocondrial de muerte mediante su dominio GH3 e independientemente de Bax y Bak, lo que sugiere la existencia de homólogos de *grim* en mamíferos.

The role of the gene *optomotor blind* in the *Drosophila* wing

Terriente Javier

CBM. UAM. Cantoblanco. Madrid

“The development of the *Drosophila* wing is governed by the action of two morphogens encoded by the genes *decapentaplegic* (a member of the BMP gene family) and *wingless* (a member of the WNT gene family), which promote cell proliferation and pattern the wing. Along the Anterior/Posterior axis the precise expression of *decapentaplegic* and its receptors is required for the transcriptional regulation of specific target genes. In the present work we analyze the function of the T-box gene *optomotor-blind*, a *decapentaplegic* target gene. The wings of *optomotor-blind* mutants have two apparently opposite phenotypes: the central wing is severely reduced and shows massive cell death, mainly in the distal-most wing, and the lateral wing shows extra cell proliferation. Here we present genetic evidence that *optomotor-blind* is required to establish the graded expression of the *decapentaplegic* type I receptor encoded by the gene *thick veins*, to repress the expression of the gene *master of thickveins*, and also to activate the expression of *spalt* and *vestigial*, two *decapentaplegic* target genes. *optomotor-blind* plays a role in wing development downstream of *decapentaplegic* by controlling the expression of its receptor *thick veins*, and by mediating the activation of target genes required for the correct development of the wing. The lack of *optomotor-blind* produces massive cell death in its expression domain, which leads to the missactivation of the Notch pathway and the overproliferation of lateral wing cells. “

Relación entre *vestigial* y la información posicional en el ala de *Drosophila*

Baena-López, L. A.;García-Bellido, A.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Centro de Biología molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid.

La forma y el tamaño de los organismos y sus órganos resultan de la integración de la información posicional con los mecanismos que controlan la proliferación, supervivencia y alocaación celular. Nosotros presentamos evidencias que indican que la expresión heterogénea de **Vestigial**, a lo largo del eje próximo-distal en el disco imaginal de ala, afecta autónoma y no autónomamente los parámetros de crecimiento. Además mostramos que la falta o el exceso de proliferación, promovido por la sobreexpresión de **vestigial** en distintos territorios del ala, está asociado a cambios en la longitud global del ciclo celular. Más aún, el control de la longitud del ciclo celular y por tanto del crecimiento en el ala distal, podría estar mediado por un sistema de señalización entre células vecinas que utilizaría las diferencias en la cantidad de **Vestigial** como escalar de información posicional.

Activation and repression activities of *ash2* in *Drosophila* wing imaginal discs

Mireia Angulo, Montserrat Corominas and Florenci Serras

Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona 08028

Polycomb (PcG) and trithorax (trxG) group genes are chromatin regulators involved in the maintenance of developmental decisions. Although their function as transcriptional regulators of homeotic genes has been well documented, little is known about their effect on other target genes or their role in other developmental processes. In this study we have used the patterning of veins and interveins in the wing as a model with which to understand the function of the trxG gene *ash2* (*absent, small or homeotic discs 2*). We show that *ash2* is required to sustain the activation of the intervein-promoting genes *net* and *blistered (bs)* and to repress *rhomboid (rho)*, a component of the EGF receptor (*DER*) pathway. Moreover, loss-of-function phenotypes of the *DER* pathway are suppressed by *ash2* mutants, whilst gain-of-function phenotypes are enhanced. Our results also show that *ash2* acts as a repressor of the vein L2-organizing gene *knirps (kni)*, whose expression is upregulated throughout the whole wing imaginal disc in *ash2* mutants and mitotic clones. Furthermore, *ash2*-mediated inhibition of *kni* is independent of *spalt-major* and *spalt-related*. Together, these experiments indicate that *ash2* plays a role in two processes during wing development: (1) maintaining intervein cell fate, either by activation of intervein genes or inhibition of vein differentiation genes, and (2) keeping *kni* in an *off* state in tissues beyond the L2 vein. We propose that the Ash2 complex provides a molecular framework for a mechanism required to maintain cellular identities in the wing development.

El papel de los Glipicanos en el tráfico de Wingless

Xavier Franch-Marro, Oriane Marchand, Eugenia Piddini, Sara Ricardo, Cyrille Alexandre and Jean Paul Vincent.

National Institute for Medical Research. The Ridgeway Mill Hill. London NW7 1AA. UK

Los ligandos extracelulares, son degradados después de unirse a su respectivo receptor y activar la correspondiente vía de transducción. La degradación se produce mediante la endocitosis del receptor. Esto conlleva a un problema fundamental de los ligandos que han de actuar a largas distancias en el epitelio, como es el caso de Wingless. De hecho se espera que los receptores de la vía, los cuales tienen alta afinidad para con el ligando, atrapen los ligandos cerca de la secreción de los mismos y por tanto prevengan el transporte hacia células más distantes. Este hecho plantea una importante cuestión, que es como se produce la localización apropiada del ligando en todas las células receptoras, las que están cerca y las que están más alejadas. En nuestro trabajo nos proponemos investigar el papel de los glipicanos Dally y Dally-like en la regulación de la distribución de Wingless en el disco imaginario de *Drosophila*. El análisis genético mediante el estudio de los mutantes de dichos proteoglicanos nos permite establecer un modelo donde en la superficie de las células de un epitelio, Dally-like atrapa Wingless pero en lugar de presentarlo a los receptores de la vía para activarla, este lo pasa a la célula adyacente, tanto para activar la vía de manera paracrina como para el transporte del ligando. Por tanto, Dally-like se encarga de hacer llegar la cantidad de Wingless a las células a lo largo del eje dorso-ventral. Por otro lado nuestro análisis genético también sugiere que el otro glipicano, Dally, actúa como un coreceptor clásico.

FINDING ASH2 DIRECT TARGET GENES BY COMBINING *IN VIVO*, *IN VITRO* AND *IN SILICO* ANALYSES

Sergi Beltran¹, Enrique Blanco², Florenci Serras¹, Roderic Guigó² and Montserrat Corominas¹

¹Departament de Genètica, Universitat de Barcelona

²Institut Municipal d'Investigació Mèdica – Universitat Pompeu Fabra – Centre de Regulació Genòmica, Barcelona

The trithorax group (trxG) and the Polycomb group (PcG) of transcriptional regulators are chromatin components, conserved throughout evolution, that maintain stable states of gene expression. Mutations in these genes result in developmental defects and have been implicated in human cancer. The *absent, small, or homeotic discs 2 (ash2)* gene is a member of the trxG that has recently been identified in several protein complexes such as the Set1C in yeast or the MLL and the SET1 HMT in humans. These complexes include, for example, HCF-1, Sin3, Menin, MLL and SET1. Mutations in *ash2* in flies cause the homeotic transformations expected for genes in this group in addition to a variety of pattern formation defects such as the alteration in the wing venation. In an attempt to identify gene targets for *ash2* in the wing, we are using microarray analysis to compare the expression profile of wing imaginal discs from isogenized *ash2* mutant larvae to that from an isogenized wild-type strain. Combining our previous microarray results, obtained with RNA extracted from whole *ash2* mutant larvae, with other studies performed with *ash2* protein complex partners, we identified *in silico* a putative regulatory motif commonly present in some of the target genes. With the aid of classical biochemical techniques and our new microarray findings, we aim to expand our knowledge regarding the function of the *ash2* gene in transcriptional regulation.

Regulación del factor de transcripción Epiprofina por FGFs y SHH durante el desarrollo embrionario.

Lucía Jiménez¹, Susana de Vega¹, Takashi Nakamura², Yoshihiko Yamada², Fernando J. Unda¹.

¹Departamento de Biología Celular e Histología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Leioa, 48940, Vizcaya.

²Molecular Biology Section, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Nuestro grupo ha identificado y caracterizado un nuevo gen similar al factor de transcripción Sp6/KLF14, llamado Epiprofina (número de acceso NCBI: AY338955). Este factor de transcripción contiene 3 dedos de zinc de unión al DNA y regula la actividad de otros genes tanto durante el desarrollo embrionario como en los tejidos adultos. El análisis del patrón de expresión ha demostrado que Epiprofina queda restringido, principalmente, durante el desarrollo embrionario del ratón, a las siguientes estructuras celulares: el epitelio dental interno (ameloblastos) y los odontoblastos, la cresta ectodérmica apical de la extremidad, el epitelio distal de la uretra y la vaina radicular del folículo piloso. A continuación, y con el fin de conocer la regulación de este gen durante el desarrollo embrionario, realizamos una serie de cultivos organotípicos. Nuestros resultados *in vitro* muestran que FGF8 y FGF9 añadidos exógenamente inhiben la expresión de Epiprofina en la región dental, al inicio de la odontogénesis. Durante la morfogénesis del primer molar, el anticuerpo anti-SHH también provoca una pérdida de la expresión de Epiprofina, que se recupera al añadir la proteína SHH. En el tubérculo genital, FGF8 induce la expresión de Epiprofina, mientras que anti-SHH provoca la desaparición de los transcritos de este gen. Por último, ratones mutantes para el gen *Shh* muestran que la expresión de Epiprofina se reduce en la cresta ectodérmica apical de las extremidades. De estos resultados se concluye que los FGFs y SHH regulan la expresión de Epiprofina en ciertos tejidos embrionarios ectodérmicos. Por un lado, SHH parece regular positivamente el gen Epiprofina, y por otro, FGF8 es un regulador positivo en el tubérculo genital, pero negativo en el desarrollo dental. Próximamente, nuestro trabajo de investigación se centrará en el conocimiento de la relación de la Epiprofina con otros genes diferentes a los estudiados, así como la función de la Epiprofina sobre la histogénesis de ciertos tejidos ectodérmicos. Este trabajo de investigación ha sido financiado por la UPV/EHU (1/UPV00077.327-E-15379/2003). Lucía Jiménez disfruta de una beca de la UPV/EHU y Susana de Vega de una beca de la Fundación Gangoiiti.

COEXPRESIÓN DE PITX2C Y PITX2B EN CORAZÓN EMBRIONARIO Y ADULTO DE RATÓN.

Hernández-Torres F, Domínguez JN, Martínez S, Navarro F y Aránega AE

Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén. 23071 Jaén.

Pitx-2 es un factor de transcripción miembro de la familia de genes homeobox que juega un papel central en los últimos eventos que conducen la asimetría derecha-izquierda durante la morfogénesis. Hasta el momento, 3 diferentes isoformas de Pitx2 han sido identificadas (Pitx2a, Pitx2b y Pitx2c), y recientemente se ha descrito una nueva isoforma (Pitx2D) en humanos. Aunque el papel que ejerce este factor de transcripción en el desarrollo del corazón no ha sido establecido, existe cierto consenso acerca de que la única isoforma de Pitx2 que ha sido identificada en corazón durante el desarrollo embrionario es Pitx2c y los patrones de expresión de esta isoforma durante el desarrollo cardiaco de ratón y de pollo han sido descritos. Nosotros hemos detectado la presencia de Pitx2b durante la cardiogénesis en ratón.

Datos obtenidos mediante RT-PCR y secuenciación revelan coexpresión de Pitx2b y Pitx2c en corazón de ratón en estadios embrionarios y fetales; así como el mantenimiento de la expresión de ambas isoformas en corazones de neonato y adultos. El análisis semicuantitativo de los resultados de RT-PCR muestran similitud en los patrones de expresión para ambas isoformas durante el desarrollo cardiaco de ratón; equivalentes niveles de expresión de Pitx2b y Pitx2c se observan en corazones de neonato; la expresión de ambas isoformas se mantiene a bajos niveles en corazones de adulto.

Nuestros resultados demuestran la presencia de diferentes isoformas de Pitx2 durante el desarrollo cardiaco de ratón; así como el mantenimiento de la expresión en corazones de neonatos y adultos. Estos datos abren un nuevo camino para diseccionar el papel de Pitx2 en la cardiogénesis y analizar la implicación de cada isoforma durante el desarrollo del corazón.

TRANSFORMACION NEOPLÁSICA DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS AB1 TRAS SU TRASPLANTE EN LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE ANIMALES ADULTOS.

Unai Silván, Alejandro Diez-Torre y Juan Aréchaga.

Laboratorio de Embriología Experimental, Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco.

La técnica de trasplante celular en los túbulos seminíferos ha sido descrita por Ogawa et al. (1). Consiste en la microinyectar una suspensión celular a través de las siguientes vías: en túbulos seminíferos aislados, en la rete testis o en los conductillos eferentes (esta última vía es la más eficiente y rápida en nuestra experiencia).

Las células madre embrionarias (ES cells) se obtienen de la masa celular interna de blastocistos y pueden ser mantenidas en cultivo en estado indiferenciado durante largos periodos de tiempo. Su característica principal es la totipotencia, es decir, cuando son inyectadas en blastocistos son capaces de dar lugar a cualquier tejido diferenciado (quimeras), incluyendo las células de línea germinal. Por otra parte las células madre embrionarias comparten muchas características con las células germinales. La línea celular AB1 es representativo de este tipo de células.

Con la idea de investigar la eventual influencia que pudiera tener el microambiente de los túbulos seminíferos sobre la capacidad de diferenciación de las células madre embrionarias AB1 en células germinales funcionales, realizamos el trasplante de dichas células en los túbulos seminíferos con los métodos anteriormente referidos. Sin embargo, en ningún caso se obtuvo esta diferenciación germinal, sino tumores con las características histopatológicas de los teratocarcinomas, siendo especialmente evidente su diferenciación neural.

(1) Ogawa T., Aréchaga J., Avarbock M.R. and Brinster R. (1997) Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int. J. Dev. Biol.*, 41: 111-122.

Beta catenin expression during vascular development and degeneration of avian mesonephros

V. Nacher, M. Navarro, A. Carretero, C. Armengol, C. Llombart, J. Blasi, J. Ruberte.

Group of Vascular Morphogenesis. Dpt. Animal Health and Anatomy. Veterinary Faculty. Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy. Autonomous University of Barcelona.

β -catenin is a component of adherens junctions, a key regulator of wnt pathway and a transcriptional coactivator. Recent studies have demonstrated that β -catenin plays a critical role during vascular development. Mesonephros is a transitory embryonic kidney, particularly interesting for the study of vascular development and degeneration. The aim of this study was to examine β -catenin expression in avian mesonephros focussing on its vascular development and degeneration. For this purpose, quail embryos with developing or degenerating mesonephros were studied, at day 6 (30HH) or day 11 (40HH), respectively. Vascular characterization of mesonephros was performed examining vascular corrosion casts by SEM and using QH1 as endothelial cell marker on paraffin sections and in toto preparations. β -catenin expression was studied by western blot and its localization examined by laser scanning confocal microscopy (LSCM) in immunofluorescence labeled paraffin sections. 30HH mesonephros presented angiogenic vessels and a high number of isolated QH1 positive cells inside the paramesonephric duct and close to it in the subcardinal venous plexus. In contrast, 40HH mesonephros showed degenerated vessels and were devoid of isolated QH1 positive cells. Western blot showed that β -catenin expression was reduced in 40HH compared to 30HH mesonephros. In addition, no differences were observed depending on the sex of the specimens. β -catenin was mainly immunolocalized in cell surface and cytoplasm, in epithelium (p.e. tubuls) and endothelium (p.e. peritular endothelial cells and glomerular capillaries). LSCM analysis showed that β -catenin expression in the glomerular capillaries was reduced in 40HH compared to 30HH. In conclusion, our results suggest that β -catenin expression was reduced during mesonephric degeneration, in a sex independent manner and particularly associated to vascular system.

Generación y análisis de clones somáticos en el embrión de ratón

Carlos G. Arques¹, Róisín Doohan¹, Victoria Campuzano², James Sharpe³, Miguel Torres¹

¹ Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid; ² Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid; y ³ Human Genetics Unit, MRC, Edimburgo.

La capacidad de inducir alteraciones genéticas en células aleatorias de un organismo en desarrollo (alteraciones que son heredadas por la descendencia de dichas células) es una herramienta fundamental en el campo de la biología del desarrollo que, sin embargo, ha permanecido hasta el presente casi totalmente restringida a un único sistema modelo. El desarrollo reciente de recombinasas inducibles y de sistemas de adquisición tridimensional de imágenes nos está permitiendo portar esta valiosa técnica al embrión de ratón.

MIEMBROS DE LA FAMILIA SNAIL Y SUPERVIVENCIA CELULAR EN LA FISURA PALATINA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA

C. Martínez-Álvarez¹; R. Pérez¹; M.J. Blanco¹; T. Martínez¹; M. Aparicio¹; E. Resel¹; M.A. Rabadán¹; MA. Nieto².

1. Departamento de Anatomía y Embriología Humana I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid.; 2. Instituto Cajal. CSIC. 28002, Madrid.

La fusión del paladar es un proceso complejo en el que cambios celulares como muerte celular y transformación epitelio-mesenquimatoso (TEM) ocurren coordinadamente en el tiempo y el espacio. Dado que miembros de la familia *Snail* de factores de transcripción están involucrados tanto en la aparición de TEM como de supervivencia celular, nosotros hemos estudiado su posible papel en la fusión palatina. Además, los genes *Snail* son inducidos por miembros de la superfamilia TGF- β y los ratones mutantes negativos para *TGF- β_3* muestran un fenotipo de fisura palatina. Hemos realizado hibridación *in situ in toto* y en secciones, inmunohistoquímica y marcaje con TUNEL en embriones y cultivos de paladar homocigotos positivos y negativos para *TGF- β_3* y de pollo. Nuestros resultados muestran que en el ratón silvestre, al tiempo de la fusión, *Snail* se expresa en células de la costura epitelial medial, lo que es compatible con su papel en inducción de TEM. Hemos encontrado una asociación interesante entre la expresión de miembros de la familia *Snail* y supervivencia celular asociada a la aparición de fisura palatina. *Snail* se expresa en el epitelio del borde medial (EBM) en ratones *TGF- β_3 -/-*, donde está activado por la expresión anómala de su inductor *TGF- β_1* en el mesénquima subyacente. A diferencia de lo que ocurre en las células del EBM del ratón silvestre, *Snail* negativas, las células del mutante negativo para *TGF- β_3* sobreviven, como lo hacen sus homólogas del pollo, portador de fisura palatina fisiológica. De forma interesante, *Slug* es el miembro de la familia *Snail* expresado en el EBM del pollo, lo que supone otro ejemplo de intercambio en la expresión de *Snail* y *Slug* entre embriones de ave y mamíferos. Proponemos que en ambas situaciones de fisura palatina, fisiológica (pollo) y patológica (ratón *TGF- β_3 -/-*), los genes *Snail* inducen la supervivencia de las células del EBM, permitiendo su diferenciación ulterior a un epitelio queratinizado y estratificado.

Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad de Madrid (CAM 08.6/0042.1/2000) a C.M.-A. y (CAM 08.1/0044/2000) a M.A.N y proyectos del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-01/1087) a C.M.-A. y (FIS-01/985) a M.A.N.y Ciencia y Tecnología (BMC2002-0383) a M.A.N.

PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL EPITELIO DEL BORDE MEDIAL EN LA GÉNESIS DE LA FISURA PALATINA PRODUCIDA EN AUSENCIA DE TGF- β_3

E. Martínez-Sanz; E. Resel; E. Trinidad; J. Murillo; A. del Río; C. Barrio; J. Valero; C. Izquierdo; ML. Martínez; L. Santiago; C. Martínez-Álvarez

Departamento de Anatomía y Embriología Humana I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid.

Los ratones mutantes negativos para el gen *TGF- β_3* presentan todos los tipos posibles de fisura palatina, desde completa a submucosa, dependiendo de la raza de ratones en la que se realiza el bloqueo del gen, que implican grados diferentes en el defecto de adhesión/fusión de los procesos palatinos. Nuestro objetivo ha sido analizar la presencia/distribución de varias moléculas de matriz extracelular y de adhesión en dos razas de ratones mutantes negativos para *TGF- β_3* y ver su importancia en el proceso de adhesión/fusión del paladar. Hemos realizado inmunohistoquímica con anticuerpos anti- fibronectina, laminina, colágenos IV y IX e integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ sobre secciones de cabezas de embriones de ratón de 14.5 días de gestación (DG) de las razas Albino Swiss y C57, silvestres y mutantes negativos para *TGF- β_3* . Asimismo, hemos efectuado cultivos de procesos palatinos de 13.5 DG, suplementados o no con *TGF- β_3* o tratados con anticuerpos anti-fibronectina o integrina $\alpha 5$. Nuestros resultados muestran diferencias en la presencia de las moléculas antedichas entre el ratón silvestre y el mutante, más acentuadas en la raza C57 que en la Albino-Swiss. La utilización de anticuerpos bloqueantes contra fibronectina e integrina $\alpha 5$ resulta en disminución estadísticamente significativa de la adhesión y fusión entre los procesos palatinos. Por tanto, concluimos que la presencia de determinadas moléculas de matriz extracelular y moléculas de adhesión relacionadas está alterada en el paladar embrionario de ratones portadores de fisura palatina debida a la ausencia de *TGF- β_3* y que la mayor o menor afectación de esta presencia puede condicionar el grado de severidad de fisura palatina observada en distintas razas de ratones frente al bloqueo del mismo gen.

Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid (Ref. 08.6/ 0001.1/2003) y Fondo de Investigación Sanitaria (PI030185).

Gene-expression profile of epithelial cells upon *Snail* transfection: Targets in the induction of epithelial to mesenchymal transitions

Agnès Boutet and M. Angela Nieto

Department of Developmental Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC. Madrid.

The cell conversion from an epithelial to a mesenchymal phenotype occurs during vertebrate embryonic development for the formation of different tissues and during the malignization of solid tumours to invade adjacent tissues. The Snail transcription factor is a key molecule in the triggering of these epithelial-mesenchymal transitions (EMT) in physiology and pathology [reviewed in Nieto, 2002]. The aim of this work was to identify targets of Snail by the use of microarrays after generating a stable cell line that had undergone EMT. In addition to molecules previously characterized as Snail targets such as E-cadherin, mucin-1, occludin and claudin-2, we also found other cadherins, including cadherin-16, a kidney specific adhesion molecule. Validation of the microarray analysis together with the analysis of the expression of Snail family members and Cadherin-16 during embryonic development suggest that Snail genes behave as general repressors of cadherin transcription. By analogy to the situation in breast tumours, we are now analyzing whether aberrant activation of Snail/Slug could be associated to pathological situations in the kidney, including fibrosis and carcinoma malignization.

Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):155-66.

Estudio del complejo cadherina/catenina y de la expresión de metaloproteasas en células madre embrionarias

Alejandro Diez-Torre, Unai Silván y Juan Aréchaga

Laboratorio de Embriología Experimental, Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco. 48940 Leioa (Vizcaya), España.

Con el objetivo de conocer los mecanismos de invasión del carcinoma embrionario testicular hemos estudiado el complejo cadherina/catenina y la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en las líneas de ratón de carcinoma embrionario experimental F9 y P19 y los resultados han sido comparados con los obtenidos en células stem embrionarias (AB1) y células germinales embrionarias (EG-1).

Mediante inmunohistoquímica y western blot se ha estudiado la expresión de los componentes del complejo cadherina/cateninas. Las cuatro líneas celulares expresan E-cadherina, a-catenina y b-catenina, mientras que solo P19 expresa ciertos niveles de N-cadherina. Mediante un ensayo de agregación con o sin tratamiento con anticuerpos bloqueantes de la E-cadherina se ha observado que esta proteína es esencial para la adhesión intercelular en las líneas no tumorales AB1 y EG-1, mientras que el bloqueo de la E-cadherina no afecta a la capacidad de agregación en las dos líneas de carcinoma embrionario, lo que sugiere que ésta se debe principalmente a otra u otras moléculas de adhesión intercelular.

Para el análisis de la expresión de metaloproteasas por parte de estas líneas celulares se han utilizado zimografías en geles de gelatina. Todas ellas expresan pro-MMP-2, si bien las líneas F9 y EG-1 secretan esta proenzima a niveles mucho más bajos que en el resto. Las líneas P19 y AB1 expresan además pro-MMP-9. Ninguna de las líneas secretan la forma activa de estas proteasas. Sería interesante continuar con el estudio del posible papel del estroma testicular como regulador de la actividad proteolítica en el frente de invasión.

Morphogenetic movements influence endoderm patterning in zebrafish

Concepción Rojo, Álvaro San Millán, Encina González

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria, UCM. Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid.

The cellular and molecular mechanisms that regulate endoderm development in zebrafish embryos have been studied during the last few years, leading to some knowledge on its formation and segregation from the mesoderm. Morphogenesis and organogenesis of the gut and its associated organs, has just begun to be understood. Much less is known about the possible role of endoderm during morphogenesis in two different ways: to which extent morphogenetic movements affect endoderm regionalization, and whether or not endoderm can guide mesodermal and/or ectodermal morphogenesis. To begin to understand this, we have analyzed mutants with defects in convergence and extension movements during gastrulation: the non-canonical Wnt signaling pathway components *silberblick* (*slb/Wnt11*), *pipetail* (*ppt/Wnt5*) and *knypek* (*kny/glypican sulfate*). *kny* and *ppt* but not *slb* mutants exhibit broader and shorter trunks. We have also constructed double mutants with another gene regulating cell movements during gastrulation, the transcription factor *notail* (*ntl/T-brachyury*). The compound mutants *kny;ntl* and *ppt;ntl* show a more dramatic phenotype compared to *kny* and *ppt* single mutants. We have studied the genetic expression in endoderm precursors during gastrulation, as well as the genetic function during the formation of both pharyngeal arches and gut and its associated organs such as the pancreas. From our initial results it seems that specification of endoderm appears normal in single and compound mutants, but not endoderm pattern. Some markers, such as *islet 1* in the pancreas and *fkdb* in the pharyngeal arches, show a different expression domain compared to *wt*, which is more evident in the double mutants. Our preliminary data suggest that defects in morphogenetic movements could lead to abnormal endoderm regionalization.

IDENTIFICACIÓN DE UN GEN REPORTER DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA JAK/STAT

Laura Cobreros

CABD (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo). Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, SPAIN.

En *Drosophila* la ruta de señalización JAK/STAT es requerida para la segmentación, desarrollo de ojos, proliferación celular, hematopoyesis, determinación sexual y desarrollo traqueal.

Los elementos básicos que componen esta ruta son el ligando UPD que se une al receptor DOME provocando la activación de la kinasa JAK que fosforila la proteína STAT citoplásmica. STAT activada dimeriza y se dirige al núcleo donde activa la transcripción de determinados genes.

Desconocemos la mayoría de los genes diana activados por STAT de *Drosophila* directamente. Esto dificulta realizar estudios sobre la modulación de la ruta de señalización.

Para resolver esto, estamos intentando localizar activados por STAT. Hemos demostrado que JAK/STAT regula en el mesodermo al gen *dome* (el receptor de esta ruta).

Usando construcciones *lacZ* mostramos que la autorregulación de *dome* está controlada por un fragmento conteniendo la secuencia TTCnnnGAA descrita como consenso de unión a STAT en *Drosophila* y de STAT1, STAT2 y STAT5 en vertebrados. Demostramos usando mutantes de falta de función y activación ectópica que este fragmento responde en el mesodermo a la activación de la ruta JAK/STAT y por tanto es un buen gen reporter.

Sorprendentemente, la subdivisión de este fragmento regulador demuestra que los elementos consenso descritos para *Drosophila* no son los responsables de la regulación. Aunque esto podría sugerir que la regulación es indirecta, la presencia en el elemento regulador de cinco sitios de unión similares al consenso de unión de STAT6 en vertebrados, apuntan a que STAT de *Drosophila* podría unir dos consensos diferentes. Esto sugeriría que la proteína STAT originariamente unía ambos sitios indistintamente, y que en vertebrados cada proteína STAT se ha especializado para reconocer cada uno de ellos.

Caracterización funcional del gen *Sip1* en *Drosophila* : buscando los *partenaires* de la DMoesina.

Carmen Alvarez¹, Fernando Roch¹, Cédric Polesello¹, Paul Mangeat², Christian Roy², Marianne Martin², François Payre¹

¹Centre de Biologie du Développement, UMR5547 CNRS, Université Paul Sabatier, Batiment 4R3, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France.

²Dynamique moléculaire des Interactions Membranaires UMR5539 CNRS – Université Montpellier

Las proteínas de la familia ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) han sido estudiadas por su implicación en numerosos procesos de plasticidad celular en los que las interacciones entre la membrana y el citoesqueleto de actina se regulan de forma dinámica. Estas proteínas poseen 2 dominios: el dominio FERM amino-terminal (región de unión a la membrana) y una zona carboxi-terminal de unión a la F-actina compuesta por 34 aminoácidos. En su forma activada, estas proteínas unen filamentos de actina con proteínas de la membrana plasmática, como el complejo de 50 Kda ERM-phosphoprotein (EBP50). De este modo establecen contactos entre el citoesqueleto y la membrana. La Dmoesina, única proteína ERM en *Drosophila melanogaster* es, igual que sus homólogos en mamíferos, un importante regulador de numerosos procesos celulares durante el desarrollo de la mosca.

En este trabajo hemos identificado en el genoma de *Drosophila* el ortólogo de la proteína humana EBP50, codificada por el gen *Sip1*. Nuestro objetivo es caracterizar la función de esta proteína en *Drosophila* para comprender mejor el papel biológico de las proteínas ERM y de sus interactores moleculares en el contexto de un proceso de desarrollo. Hemos podido demostrar que in vitro la proteína Sip1 se une a la proteína Dmoesina, indicando que estas proteínas podrían funcionar juntas también in vivo. En este momento estamos trabajando en la caracterización genética y funcional del gen *Sip1*. Para ello hemos creado mutantes para dicho gen y estamos analizando los fenotipos ocasionados por su pérdida de función a lo largo del desarrollo de la mosca y en distintos tejidos como los ovarios y la epidermis de los discos imaginales.

POSTERS
21 SEPTIEMBRE/ SESION B

B1- Organización de la glía radial en el diencéfalo del embrión de pollo

Ana Cristina Delgado Fumero, Antonia Alonso Fuentes, Carmen María Trujillo Trujillo.

B2.-Role of smad1 in dorsal and intermediate neural tube patterning

Lidia Garcia-Campmany y Elisa Martí

B3- Neurogénesis temprana del ganglio cócleo-vestibular.

Itziar Gorospe, Berta Alsina, Yolanda León, Fernando Giráldez y Isabel Varela-Nieto.

B4.-Implication of Fibroblast Growth Factors during induction and morphogenesis of the inner ear

Laura Zelarayán, Oleg Lioubinski, Yolanda Alvarez, Victor Vendrell, Sybille Köhnke, Teresa Alonso and Thomas Schimmang

B5.- Development of the Avian and Mammalian *Locus coeruleus* in the rostral hindbrain

Pilar Aroca, Beatriz Lorente-Cánovas and Luis Puelles

B6- Influencia diferencial del fgf-2 sobre las distintas vesículas cerebrales en el desarrollo temprano del embrión de pollo.

Martín C., Alonso M.I., Callejo S., Higuero S., Juárez A., Moro J.A., de la Mano A., Santiago C., Bueno D., Gato A.

B7.- Interleukins 1 β and 6 expression in the peripheral nervous system of rat embryo

A. de la Mano, A. Gato, M.I. Alonso, C. Martín, J.A. Moro

B8.-Effect of embryonic cerebrospinal fluid on spinal cord neurogenesis in chick embryo

J.A. Moro, A. de la Mano, M.I. Alonso, C. Martín and A.Gato.

B9.- Presencia de retinol y proteínas transportadoras en el Fluido Cerebro-espinal Embrionario

Carolina Parada, Ángel Gato, David Bueno.

B10.-Estudio de la expresión y función de smad5 en el desarrollo del tubo neural

Iria Ríos y Elisa Martí

B11.- Single-cell transcript analysis of hindbrain pre-rhombomeres

Citlali Vázquez, Lauro Sumoy*, Cristina Pujades

B12.-Experimental study of MAP kinase phosphatase-3 (*Mkp3*) expression in the chick neural tube in relation to Fgf8 activity.

Claudia Vieira and Salvador Martinez

B13.- Tgf-betas in the developing nervous system.

Rabadán, M.A., J. Vázquez, J. Pérez-Miguelsanz, A. Peña-Melian, C. Maestro and M. J. Blanco.

B14.- The chick embryo: a natural model for alzheimer research

José A. Carrodeguas, Annie Rodolosse, Martha V. Garza, Antonio Sanz-Clemente, Rosaura Pérez-Pé, Ana M. Lacosta, Luis Domínguez, Víctor Sorribas, and Manuel Sarasa

B15.- Topologic analysis of the *Orthopedia* positive paraventricular nucleus primordium relative to the forebrain alarbasal boundary.

Sylvia Bardet, Luis Puelles

B16.- Reorganización del núcleo celular de las neuronas del ganglio del trigémino durante el desarrollo postnatal y su relación con la maduración bioeléctrica neuronal.

Iñigo Casafont*, Marcos Altable, Itziar Alonso, Miguel Lafarga y M^a Teresa Berciano.

B17.- Control of the proliferation and survival of neural precursors in the spinal cord: a new role for the shh pathway

Cayuso, J. and Marti, E.

B18.- Cellular Proliferation in the Urorectal-Septation Complex of the Human Embryo: a Morphometric Study at Carnegie Stages 13-18.

Josep Nebot-Cegarra, Pere-Jordi Fàbregas and Inma Sánchez-Pérez

B19.- La eliminación de la regulación por miRNA del gen INCURVATA4 de *Arabidopsis thaliana* altera el patrón vascular del tallo.

Isabel Ochando, Antonio Vera y Antonio Martínez-Laborda

B20.- Endoderm Patterning in *Xenopus laevis*

Ricardo Costa

B21.- Calcitonina en la región más dorsal del tubo neural

Jesús Canudas, Pedro Muniesa, Víctor Sorribas, Hassnae Badi, Ana M. Lacosta, Julia Catalán, Salvador Climent y Manuel Sarasa

B21.-Evolución de la placenta y el trofoblasto en vertebrados

Susana Cañón y Miguel Manzanares.

ORGANIZACIÓN DE LA GLÍA RADIAL EN EL DIENCÉFALO DEL EMBRIÓN DE POLLO

Ana Cristina Delgado Fumero, Antonia Alonso Fuentes, Carmen María Trujillo Trujillo.

Dpto. de Microbiología y Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de la Laguna, Tenerife.

La subdivisión estructural del diencéfalo puede ser considerada atendiendo a diferentes criterios morfológicos y moleculares. La región diencefálica del pollo muestra un patrón neuromérico desde los primeros estadios embrionarios. Este territorio ha sido subdividido en tres dominios transversales que contienen las siguientes estructuras. En la placa alar encontramos el pretectum (prosómero 1; p1), tálamo dorsal y epitálamo (prosómero 2; p2), tálamo ventral y eminencia talámica (prosómero 3; p3), la placa basal incluye el núcleo intersticial de Cajal (p1), núcleo intersticial rostral (p2) y los campos de Forel (p3).

Es conocido que, en el sistema nervioso central las prolongaciones de la glía radial son capaces de guiar a las neuronas inmaduras desde la zona ventricular a su lugar de diferenciación. Nosotros hemos usado inyecciones intraventriculares de DiI en cerebros embrionarios de pollo para establecer si estas prolongaciones gliales tienen alguna responsabilidad en la regionalización diencefálica.

Nuestros resultados demuestran la presencia de glía radial desde estadios tempranos del desarrollo embrionario. Algunas regiones diencefálicas contienen prolongaciones de glía radial fasciculada que se localizan en los límites entre los prosómeros, así tenemos por ejemplo, el límite entre el tálamo dorsal-ventral o bien, el límite entre el pretectum y mesencéfalo. A su vez, las subdivisiones intraprosoméricas muestran distintos patrones en la disposición de la glía radial, como ocurre en el pretectum y el tálamo dorsal. En general, la distribución de la glía radial en el diencéfalo embrionario del cerebro de pollo coincide con los límites en la expresión de genes y los límites citoarquitectónicos definidos por otros criterios. Hemos comparado estos resultados con estudios previos hechos en el cerebro de lagarto, constatando que comparten un patrón glial similar.

ROLE OF SMAD1 IN DORSAL AND INTERMEDIATE NEURAL TUBE PATTERNING

Lidia Garcia-Campmany y Elisa Martí

Instituto de Biología Molecular de Barcelona-CSIC, Parc Científic de Barcelona

In the developing spinal neural tube, distinct populations of neural progenitor cells generate by expressing a unique combination of transcription factors and eventually differentiate into specific classes of neurons at stereotypical locations along the dorsal-ventral axis. Understanding patterning mechanisms that restrict developmental potential of the neural precursors in the vertebrate Central Nervous System (CNS) is beginning to be elucidated. Bone Morphogenetic proteins (BMPs) and other Transforming Growth Factor β (TGF β) family members are expressed at the dorsal midline (the roof plate, RP) and dorsal third of the neural tube. BMP-like signals have been shown to pattern both dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeodomain and basic helix-loop-helix transcription factors. The BMPs could have overlapping functions providing patterning information to the neuroepithelial cells and may establish a dorsal domain of graded BMP activity such that different cell types are specified by distinct levels of BMP signalling. To determine the mechanisms underlying BMP activity in patterning the neural tube, we have undertaken expression and functional analysis of Smad1, an intracellular mediator of the BMP pathway, in the chick embryo. Smad1 is expressed by neural progenitors within the ventricular zone (VZ) of the developing neural tube excluding both RP and floor plate (FP) cells. Later, it becomes restricted to the dorsal two thirds of the neural tube and marks dorsal interneuron populations at the putative location of dI1 and dI3. Misexpression of wild type hSmad1 by in ovo electroporation modulates expression boundaries of distinct dorsal and intermediate progenitor markers, that correlate in some extent with the identity changes seen by several interneuron populations. Our results suggest that the BMP-signalling down-stream effector Smad1 regulates patterning of both dorsal and intermediate cells and thus triggers cell type specification in the neural tube.

Neurogénesis temprana del ganglio cócleo-vestibular.

^aItziar Gorospe, ^bBerta Alsina, ^aYolanda León, ^bFernando Giráldez y ^aIsabel Varela-Nieto.

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Arturo Duperier 4, Madrid. ^bDCEXS, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, E-08003, Barcelona.

La generación de neuronas óticas es un proceso secuencial que comienza con la especificación de sus precursores en el epitelio ótico. Éstos son los neuroblastos epiteliales que delaminan de la vesícula ótica, VO, para formar el ganglio cócleo-vestibular, CVG. Los neuroblastos ganglionares recién generados proliferan y se diferencian en las neuronas que inervarán los órganos sensoriales coclear y vestibular. Nuestro trabajo, en el desarrollo del oído interno de aves, ha demostrado la participación del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, IGF-I, en la progresión de los neuroblastos auditivos hacia neuronas post-mitóticas. El IGF-I no parece ser necesario para la determinación temprana, ni para la delaminación de los neuroblastos, pero sí esencial para la supervivencia y diferenciación de los neuroblastos ganglionares en la etapa anterior a la dependencia de las neurotrofinas 1. Hemos observado que existe una secuencia temporal y espacial en la migración de los neuroblastos del epitelio ótico al CVG, que sugiere que los precursores neuronales maduran y diferencian de distal a proximal con respecto al epitelio neurogénico. Para estudiar cuándo y en dónde se determina el destino diferencial coclear o vestibular de los progenitores neuronales hemos analizado los patrones de expresión de alguno de los genes tipo bHLH de la familia NeuroD: *NeuroD* y *NeuroM* y su colocalización espacio-temporal con marcadores de identidad neuronal (*Islet1/2*, *3A10*, *G4*) y receptores de neurotrofinas. Nuestros resultados sugieren que existen dos poblaciones distintas, posiblemente determinadas muy temprano por la expresión diferencial de *NeuroM* (vestibular) y *NeuroD* (coclear). *NeuroM* se coexpresa con *Islet1/2* y parcialmente colocaliza con neuroblastos en diferenciación que expresan el receptor *TrkC*. Sin embargo, al observar la expresión de *NeuroD* no existe esta colocalización. Estos datos sugieren que *NeuroM* y *NeuroD* podrían estar expresados en los neuroblastos vestibulares y cocleares respectivamente y conferirles la identidad como tales.

¹ Camarero G., León Y., Gorospe I., De Pablo F., Alsina B, Giráldez F and Varela-Nieto I. *Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transitamplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons*. *Develop Biol* Vol 262, 242-253, 2003. Este trabajo se ha realizado gracias a una beca predoctoral del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza (I.G.) y al proyecto BMC2003-07751-C03-02 (I. V.-N.)

Implication of Fibroblast Growth Factors during induction and morphogenesis of the inner ear

Laura Zelarayán, O. Lioubinski, Y. Alvarez, V. Vendrell, S. Köhnke, Teresa Alonso and Thomas Schimmang
Center for Molecular Neurobiology Hamburg (ZMNH)-Germany

The formation of the vertebrate inner ear has been postulated to comprise several stages during which signals coming from the hindbrain neural tissue next to the developing placode and the underlying mesoderm cooperate to complete the formation of the otic vesicle. Due to their gene expression patterns and various experimental approaches several members of the fibroblast growth factor (FGF) gene family, including FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGF-10 and FGF-15/19 have been implicated in different stages of inner ear formation. The expression of FGF-3 and FGF-10 partially overlaps during otic morphogenesis and they have been suggested to act via parallel signalling pathways.

By using loss- and gain-of-function approaches carried out in avian and mammals we report our findings on the implication of FGFs during the induction in the inner ear. We addressed the role different FGF family members (FGF3, FGF10) as potential neural signals for otic induction and morphogenesis by in ovo electroporation into the neural tube of chicken embryos resulting in structures with otic fate. Knockdown approaches were carried out using morpholino antisense oligonucleotides and RNAi directed against different FGFs. To clarify the roles of FGFs during inner ear development in mammals we analyzed FGF3 and FGF3/FGF10 double mutant mice. We have generated a mutant allele lacking the entire FGF3 coding region. These mutants showed none of the previously reported inner ear defects in a FGF3 mutant mouse, where a neomycin resistance gene had been inserted into the coding region. Double mutants showed a severe loss of otic tissue and a lack of the cochleovestibular ganglion.

To further identify genes activated or repressed by FGF signaling during otic vesicle development, we analyzed gene expression profiles of otic tissue in mice lacking FGF-3, FGF-10, or both genes. For this purpose, Affymetrix GeneChip technology was employed. In FGF mutant mice we found altered expression of known otic genes, as well as genes not previously implicated in inner ear development. Identification of FGF target genes will help to elucidate the molecular switches governing morphogenesis of the inner ear and other organ systems whose formation depends on FGF signalling.

Development of the Avian and Mammalian *Locus coeruleus* in the rostral hindbrain

Pilar Aroca*, [Beatriz Lorente-Cánovas](#) and Luis Puellas

Department of Human Anatomy, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain

We investigated in the mouse and chick the neuroepithelial development and origin of the *Locus coeruleus*, the most important noradrenergic neuronal population in the brain.

In this work we focus on the study of the *Locus coeruleus* (LoC) development, mapping the transcription factors Phox2a and Phox2b, and dopamine-beta-hydroxylase, in comparison with other markers. We observed similar early and late phases of LoC development in both species. The LoC neurons first appear in the middle third alar plate of the rhombomere 1, exactly at the same place where in a later stage appears a ventricular transiently expressing Phox2a/b band (not noradrenergic), a possible cell source for LoC neurons. We observed distinct rostral and caudal parts of LoC and is also according to the two subdivisions of the rhombomere1 proposed by Vaage in 1969.

Our data are consistent with a small ventralward tangential migration of the LoC cells from this early alar location to the definitive periventricular, at the dorsalmost part of the basal plate. These results were corroborated using stable internal markers in the rostral hindbrain.

Acknowledgements: This work was supported by a grant of the Spanish MCYT grant BFI2002-03668 to L.P. BES-2003-1329 (B. L-C.). P.A. received a Ramón y Cajal researcher contract.

INFLUENCIA DIFERENCIAL DEL FGF-2 SOBRE LAS DISTINTAS VESICULAS CEREBRALES EN EL DESARROLLO TEMPRANO DEL EMBRION DE POLLO.

[Martín C.](#), Alonso M.I., Callejo S., Higuero S., Juárez A., Moro J.A., de la Mano A., Santiago C., *Bueno D., Gato A.

Departamento de Anatomía y Radiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

El comportamiento de las células neuroepiteliales en las fases tempranas del desarrollo cerebral, es regulado por factores de crecimiento entre los que destaca el FGF-2. Nosotros previamente hemos demostrado la presencia de este factor en el CSF embrionario, así como que este fluido es capaz de influir en el control de la replicación y la neurogénesis de los precursores neuroepiteliales, probablemente actuando el FGF-2 sobre receptores de la superficie apical de estas células.

El ritmo de replicación y neurogénesis en las distintas partes del cerebro embrionario, es variable. En el presente estudio, demostramos que el bloqueo de la actividad biológica del FGF-2 en el CSF embrionario afecta de forma diferencial a cada una de las vesículas cerebrales (Prosencéfalo, Mesencéfalo y Rombencéfalo), sugiriendo que la actividad de esta vía de control del comportamiento de las células neuroepiteliales durante el desarrollo, depende de la regulación en la capacidad de respuesta (probablemente por expresión de receptores apicales) al FGF-2 de las distintas regiones neuroepiteliales.

INTERLEUKINS 1 β AND 6 EXPRESSION IN THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM OF RAT EMBRYO

A. de la Mano, A. Gato, M.I. Alonso, C. Martín, J.A. Moro

It's known that interleukins 1 β and 6 (IL-1 β and IL-6) are present in a normal way in some areas of adult brain, and that their expression increases in certain neurodegenerative diseases. It has been demonstrated also that they act as neurotrophic factors that promote survival, differentiation and growth of certain kinds of neurones in culture. Furthermore, interleukins overexposure causes neurologic syndromes in transgenic mice. These data suggest that interleukins may play a significant role in the adult nervous system, both in normal and pathological conditions; however, there are very few data about their expression and function during embryonic development. In this work we carry out an immunocytochemical study on IL-1 β and IL-6 expression in the nervous system of rat embryos between 9.5 and 20.5 days post-coitus, both in the cephalic region and cranial nerves ganglia, and in the brachial region of the spinal cord. According to our results, the immunoreactivity for both interleukins appears in the spinal cord at embryonic day 12.5, mainly in mantle layer and peripheral nerves roots and ganglia, increasing its intensity at later stages. At cephalic region, IL-6 expression begins diffusely at embryonic day 14.5 in all brain vesicles, stronger in periventricular areas and diencephalon floor (prospective hypothalamic region); IL-6 marking appears also in trigeminal nerve and ganglion. These expression regions coincide with that of IL-1 β , although this one appears slightly later. In 16.5 days embryos also appears a strong IL-1 β expression in the infundibulum pituitary. The proportion of cells expressing IL-1 β and IL-6 and the immunomarking intensity at brachial and cephalic level increase as development progress. The location pattern of both interleukins is very similar, although there are little temporal differences in relation to the beginning of their expression.

EFFECT OF EMBRYONIC CEREBROSPINAL FLUID ON SPINAL CORD NEUROGENESIS IN CHICK EMBRYO

J.A. Moro, A. de la Mano, M.I. Alonso, C. Martín and A.Gato.

Departamento de Anatomía y Radiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. Spain.

In early developmental stages, cerebrospinal fluid (CSF) shows a high protein concentration in comparison with that of the adult, and we have previously detected in its composition the presence of certain growth factors and cytokines, which act as neuroblasts proliferation, survival and differentiation regulators in brain vesicles. In order to verify whether CSF has effect on other neuroblast populations, we have evaluated its action on neural differentiation chick embryo spinal cord. We have used 150-250 μ m diameter heparin acrylic micro-beads impregnated with CSF (obtained by microaspiration of the mesencephalic cavity, of stage-25 H.H. chicken embryos) in the experimental embryos, or with Ringer solution in the control embryos. Micro-beads were placed, by means of "in ovo" micro-dissection, laterally or inside to the spinal cord at the wing primordium level, in stage 17-18 H.H. embryos, which were then reincubated for 24 hours until reaching stage 22-23 H.H. In these embryos we evaluated, A: medullar morphology, using conventional optic microscopy techniques, and B: neural differentiation by β 3-tubulin immunostaining. When micro-beads were placed laterally to the spinal cord, experimental embryos showed an excessive growth in the alar plaque towards the micro-bead implantation area, developing in many cases tubular structures resembling a pseudo-stratified epithelium. More intense β 3-tubulin immunostaining around the micro-beads was observed in the experimental embryos with respect to the controls, so much when they were placed laterally to the spinal cord as inside to the medullar cavity. On the other hand, in the experimental embryos, when the micro-beads were placed inside the medullar cavity, the β 3-tubulin immunolabelling extended around this cavity and toward the alar plaque, while in the controls defined immunostaining only appeared in the lateral areas of the basal plaque. In conclusion, our study shows that embryonic CSF has effect on spinal cord neurogenesis during the embryonic development.

Presencia de retinol y proteínas transportadoras en el Fluido Cerebro-espinal Embrionario

Carolina Parada¹, Ángel Gato², David Bueno¹.

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona; ²Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid

El desarrollo del Sistema Nervioso Central a partir de un primordio relativamente simple involucra la acción simultánea e interdependiente de diferentes mecanismos de desarrollo, incluyendo el establecimiento de identidades posicionales, mecanismos morfogénicos e histogénesis. Se ha descrito la presencia de moléculas difusibles comprometidas en la regulación de estos procesos que son secretadas localmente por determinados centros organizadores, las cuales actúan sobre las células adyacentes mediante una vía autocrina/paracrina. Sin embargo, se ha demostrado que el tejido neural no es completamente autónomo y que el fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF), contenido en la cavidad de las vesículas cerebrales que se encuentra en contacto con las células madre neuroepiteliales, tiene la capacidad de promover su supervivencia, proliferación y neurogénesis *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que el E-CSF posee moléculas señalizadoras extraneurales necesarias para la regulación de estos procesos de desarrollo. Recientemente, usando electroforesis bidimensional y secuenciación de proteínas hemos identificado algunos de los componentes de la fracción proteica del E-CSF en embriones de pollo. Éstos incluyen proteínas de matriz extracelular, activadores de la vía de MAP quinasa y transportadores de lípidos y hormonas. También hemos identificado la presencia de tres proteínas que poseen un papel esencial en el transporte de retinol en suero y CSF, que interactúan durante el desarrollo: *Transthyretin chain A* (prealbumina), *Plasma Retinol-binding protein* y *Prostaglandin D2 synthase*. Mediante extracción de moléculas solubles en solventes orgánicos a partir del E-CSF de embriones de pollo usando etanol-cloroformo y la aplicación de técnicas de cromatografía líquida (HPLC) hemos observado cuatro picos, uno de los cuales presenta un tiempo de elución correspondiente a all-*trans*-retinol de acuerdo con los controles utilizados. Los otros tres picos podrían ser derivados del ácido retinoico u otras moléculas liposolubles, que están siendo actualmente analizadas mediante espectrometría de gases. Con el objetivo de aproximarnos a la función del all-*trans*-retinol presente en el E-CSF durante el desarrollo se están realizando experimentos que incluyen incrementar la concentración del mismo, bloquear la actividad de la *Retinol binding protein* para interferir en el transporte de retinol y secuestrar los retinoides presentes en el E-CSF mediante los antagonistas de RXR (*Retinoic-X-receptors*) y RAR (*Retinoic acid receptors*), tanto a nivel general a través de la circulación sanguínea como localmente en la cavidad mesencefálica, así como también en pruebas *in vitro*. Los parámetros en análisis son proliferación celular, apoptosis, diferenciación y expresión génica.

La presencia tanto de proteínas transportadoras de retinol como de él mismo en el E-CSF sugiere alguna actividad en la regulación del comportamiento de las células neuroepiteliales como ya ha sido establecida para el fluido completo. El retinol proveniente del E-CSF podría actuar como morfógeno complementando las funciones de otras moléculas del mismo tipo originadas en los centros organizadores.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE SMAD5 EN EL DESARROLLO DEL TUBO NEURAL

Iria Ríos y Elisa Martí

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC), Parc Científic de Barcelona. Barcelona 08036

La medula espinal de vertebrados es la responsable del control y coordinación de todas las aferencias sensoriales y respuestas motoras del sistema nervioso central. La totalidad de las neuronas que la forman se originan desde un neuroepitelio pseudoestratificado (zona ventricular, ZV) que por procesos de invaginación, proliferación, patterning, migración y diferenciación, da lugar a la medula espinal adulta.

Uno de los procesos de patterning más importantes es el que genera la regionalización en el eje dorsoventral del tubo neural, permitiendo la generación de once subpoblaciones de progenitores. El establecimiento de los límites de dichos progenitores se considera mediado por dos centros señalizadores: en la parte más ventral la notocorda y la placa de suelo son fuentes del potente morfógeno Shh (Sonic hedgehog) que induce interneuronas ventrales (V0-V3) y motoneuronas (MN), mientras que en la parte dorsal, el ectodermo noneural, la placa de techo, y las subpoblaciones más dorsales de interneuronas se convierten progresivamente en fuentes de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) y proteínas relacionadas, que ejercen una acción opuesta a la de Shh, induciendo interneuronas dorsales y sensoriales (dI1-dI6).

Se conoce que los R-Smads son los últimos efectores transcripcionales de las señales mediadas por las proteínas de la familia de las TGF β , y que las BMPs median exclusivamente a través de 3 R-Smads: Smad1, Smad5, y Smad8.

Este trabajo inicia el estudio de la expresión y actividad de Smad5 en el tubo neural de pollo en desarrollo, intentando discriminar su papel como mediador de las señales dorsalizantes, y evaluar su importancia en la generación en la posición adecuada y el número correcto de las diferentes subpoblaciones neuronales que constituyen la medula espinal.

Single-cell transcript analysis of hindbrain pre-rhombomeres

Citlali Vázquez, Lauro Sumoy*, Cristina Pujades

Grup de Biologia del Desenvolupament, DCEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

*Centre de Regulació Genòmica, Barcelona

In the hindbrain, anteroposterior (AP) patterning involves a segmentation process that leads to the formation of seven bulges named rhombomeres (r). Early events leading to the segmentation of vertebrate hindbrain into rhombomeres with distinct identities are still not well understood. Cell patterning along the AP axis has been shown to be initiated during gastrulation and subsequently refined during neurulation. Cells are specified or committed to different rhombomere fates before morphological distinctions among them could be discerned. This commitment is presumably accompanied by changes in gene expression.

To identify novel genes expressed in specific rhombomers in mice we have explored the use of transcriptional profiling of single pre-rhombomeric cells, in the context of hindbrain segmentation by analyzing cells when the specification of the identity of the segment is just beginning. DNA microarray analysis was combined with single-cell PCR procedure to study gene expression profiles of single cells from different pre-rhombomeric territories (pre-r4 and pre-r5). In order to know its liability, we are currently analyzing the microarray results, and confirming the gene differential rhombomeric expression by *in situ* hybridization experiments.

This work was supported by grants MCyT I+D BMC2003-07751-CO3-03 and PICS-CNRS 2003 to C.P., and a fellowship of CONACYT (México) to C.V.

Experimental study of MAP kinase phosphatase-3 (*Mkp3*) expression in the chick neural tube in relation to Fgf8 activity.

Claudia Vieira and Salvador Martinez

Instituto de Neurociencias, CSIC-Universidad Miguel Hernandez, Alicante, Spain.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways have a function in the transduction of extracellular signals to intracellular targets in all eukaryotes. The activation of this cascade will have a response in terms of cell proliferation, differentiation and apoptosis. In this study we describe the cloning of the chick *Mkp3* gene that is highly homologous to the mammalian gene and are both expressed in several embryo regions with demonstrated morphogenetic activity. In the analysed stages *Mkp3* is expressed in a very similar manner to *Fgf8*. But we have detected a difference in the activation of *Mkp3* transcription precisely in the isthmus organizer, suggesting that Fgf8 protein controls *Mkp3* transcription. Ectopically localized Fgf8 protein induces *Mkp3* in the diencephalon in a very short period of time, indicating a direct positive regulation of *Mkp3* by *Fgf8*. Moreover we show a distinct tissue competence to express *Mkp3* rostrally and caudally to the zona limitans intrathalamica.

TGF-BETAS IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM.

Rabadán, M.A., J. Vázquez, J. Pérez-Miguelsanz, A. Peña-Melian, C. Maestro and M. J. Blanco.
Departamento. de Anatomía y Embriología Humana I. Universidad Complutense de Madrid.

Transforming growth factors beta (TGF- β s) play important roles in many different developmental processes. As multifunctional growth factors, they are involved in extracellular matrix formation, cell-cycle control, regulation of early development, differentiation, angiogenesis, chemotaxis and immune reactions. However, their roles in nervous system development have only started to be known. In particular, the expression pattern of the three isoforms (TGF- β 1, - β 2, and β 3) during morphogenetic movements leading to the formation of the neural tube is not well documented. In this work, we present data on localization of TGF- β s in the developing mammalian and avian nervous system. To evaluate a possible role of the presence of TGF- β s in the process of the neural tube formation, patterns of expression are described before and close after the neural tube is closed and studied in relation to fusion of the neural epithelium. In addition, we paid attention to proliferative areas within developing nervous system in order to correlate the presence of these growth factors with cell proliferation/death processes as well as migration of newly produced cells by comparing the results with those from TGF- β 3 null mutant mice. Preliminary results indicate that TGF- β 2 and TGF- β 3 are present in the spinal cord in regions where the cells are dividing and moving away. Through the expression pattern observed in wild type embryos and the phenotype observed in the spinal cord of TGF- β 3 deficient mice, we propose that the presence of these isoforms might be related to migration of neural cells on a glial substrate, although experimental approaches needs to be performed to evaluate its functional significance.

THE CHICK EMBRYO: A NATURAL MODEL FOR ALZHEIMER RESEARCH

José A. Carrodeguas, Annie Rodolosse, Martha V. Garza, Antonio Sanz-Clemente, Rosaura Pérez-Pé, Ana M. Lacosta, Luis Domínguez, Víctor Sorribas, and Manuel Sarasa
Laboratory of Neurobiology, University of Zaragoza

Alzheimer's disease is an age-related dementia characterized by the progressive accumulation in the brain of the beta-amyloid peptide (A β) after sequential proteolysis, by beta and gamma secretases, of the much larger precursor protein, APP. We have cloned the principal APP isoforms in the chick embryo and found that they are highly homologous to the human sequences and identical at the C-terminal sequence, including the A β domain. Mammals as rat or mouse, more commonly used as animal models of human diseases, have a distinct A β sequence. The distribution of APP isoforms in the chick embryo revealed that, as in humans, their expression is ubiquitous and the prototype APP-695 predominated in the nervous system. We have also found that the chick embryo expresses the genes for the main proteolytic proteases implicated in the production of A β , including BACE-1, BACE-2, presenilin-1, presenilin-2 and nicastrin, as well as the A β -degrading enzyme neprilysin, or ADAM-17, a protease implicated in the non-amyloidogenic processing of APP. After chronic treatment of the embryos with A β peptides or fragments, some of them produced vascular fragility, a characteristic lesion in the brains with Alzheimer's disease, or developmental retardation and regression of the caudal third. These results show that the chick embryo appears to be a natural experimental model to study the cell biology and developmental function of Alzheimer's APP and a potential assay system for drugs used to regulate APP processing.

Topologic analysis of the *Orthopedia* positive paraventricular nucleus primordium relative to the forebrain alarbasal boundary.

Sylvia BARDET, Luis PUELLES
Departamento de anatomía humana y psicobiología de la Facultad de medicina de Murcia

The paraventricular nucleus (PVN) is a well-known component of the hypothalamus, implicated in various neurosecretory and central autonomic functions. The developmental mechanisms controlling the patterning of this center are still unknown. Relative to the longitudinal axis of the brain, the PVN is located at or near its rostralmost end. Its dorsoventral topological location is less clear, though it has been postulated to lie within the optoeminal alar domain of the secondary prosencephalon, surrounded dorsally and ventrally by areas expressing homeobox genes of the Dlx family. This locus is characterized early on by expression of the gene *Orthopedia* (*Otp*).

In this work, we studied in chick embryos the localization of the *Orthopedia* (*OTP*) positive PVN primordium relative to the alarbasal boundary in the secondary prosencephalon, using the expression of *Nkx2.1* as a basal plate marker in the hypothalamus and *Dlx5* as an alar plate marker. The position of the PVN primordium relative to the telencephalic subpallial expression domains of these markers was also considered.

We observed that the *OTP* positive zone is strictly contained within the extratelencephalic alar domain of the rostral forebrain, and is separated by bands of *Dlx5* expressing neural wall from the domains where *Nkx2.1* is expressed in the subpallium and basal hypothalamus. The embryonic PVN is composed of distinct dorsal and ventral parts, and its caudal end (its more voluminous part) abuts the diencephalic prosomere p3 (primordium of prethalamus; the "old" ventral thalamus).

REORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO CELULAR DE LAS NEURONAS DEL GANGLIO DEL TRIGÉMINO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL Y SU RELACIÓN CON LA MADURACIÓN BIOELÉCTRICA NEURONAL.

Iñigo Casafont*, Marcos Altable, Itziar Alonso, Miguel Lafarga y M^a Teresa Berciano.

Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria; Servicios de Neurología y Neurofisiología Clínica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

La diferenciación postnatal de las neuronas del ganglio del trigémino (NGT) comporta importantes cambios en la expresión génica y actividad transcripcional. En este estudio analizamos el comportamiento de tres parámetros nucleares, tamaño nuclear, número de nucleolos y número de Cuerpos de Cajal (CBs), relacionados con la actividad transcripcional, síntesis y procesamiento de rRNAs y procesamiento de mRNAs, respectivamente. Pretendemos investigar si estos cambios nucleares se relacionan con el proceso de mielogénesis y con el incremento asociado de la velocidad de conducción.

Nuestros estudios de inmunofluorescencia, con marcadores específicos para componentes nucleares, microscopía confocal láser y cuantitativos demuestran un aumento progresivo en el número de CBs y una disminución del número de nucleolos durante el proceso de diferenciación neuronal. La reducción del número de nucleolos se produce por un mecanismo de fusión nucleolar. Estos cambios se acompañan de un aumento progresivo del tamaño nuclear estimado sobre preparaciones inmunomarcadas con un anticuerpo anti-panHistona. Los estudios de la velocidad de conducción, mediante la estimulación de los receptores cutáneos del morro de la rata y registrando directamente en el ganglio del trigémino, demuestran un gran incremento progresivo de la velocidad de conducción durante el primer mes del periodo postnatal, asociado a la mielogénesis de las fibras nerviosas.

Los cambios nucleares observados reflejan un incremento de la actividad transcripcional y del procesamiento de rRNAs y mRNAs durante el periodo postnatal que se relacionan claramente con la maduración de la actividad bioeléctrica neuronal.

* Becario Pre-Doctoral de la Fundación Marqués de Valdecilla (IFIMV) de Santander.

CONTROL OF THE PROLIFERATION AND SURVIVAL OF NEURAL PRECURSORS IN THE SPINAL CORD: A NEW ROLE FOR THE SHH PATHWAY

Cayuso, J. and Marti, E.

CSIC.Instituto de Biología Molecular de Barcelona.Parc Cientific de Barcelona

The role of the morphogen Shh in the establishment of the dorso-ventral patterning of the vertebrate spinal cord is well known: Shh regulates the expression of class I and class II genes in a concentration-dependent manner. This first pattern is then refined by mutual cross-inhibition between class I and class II genes expressed in adjacent regions along the dorsoventral axis.

In more rostral regions of the central nervous system Shh has been also related to the regulation of the proliferation of several cell types like the granule neuron precursor cells in the cerebellum by direct transcriptional induction of genes responsible for the control of cell cycle such N-myc. Moreover it has been shown that when Shh pathway is ectopically activated in the dorsal regions of the spinal cord it induces overproliferation of this tissue. These data suggest that Shh could play a role in the control of proliferation of spinal neuronal precursors.

To check if Shh pathway play this extra role in addition to the establishment of the dorsoventral patterning in the spinal cord we have performed *in ovo* electroporations of chicken neural tube with two pathway inhibitors: Ptc Δ loop2 and Gli3R. Ptc Δ loop2 is a mutated form of the Shh receptor patched that lacks one of the extracellular loops required for the interaction with the ligand while Gli3R is a truncated form of Gli3 that resembles the repressor form of Gli3 normally generated in cells that do not receive Shh and responsible for the transcriptional inhibition of the pathway target genes.

The electroporated side of the chicken neural tubes obviously show a disruption of the DV patterning revealed by the dorsal to ventral expansion of several dorsal markers such Pax7. Electroporated embryos also show a small tube phenotype produced by an inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis of neuronal precursors in a cell-autonomous manner and along the entire DV axis.

These data support a model where basal Shh signalling is required for survival and proliferation of neural precursors even at the most dorsal regions of the spinal cord.

Proliferación celular del complejo de septación uorrectal del embrión humano: Estudio morfogénico en los estadios Carnegie 13 a 18.

Josep Nebot-Cegarra¹, Pere-Jordi Fàbregas¹ y Inma Sánchez-Pérez²

¹ Unidad de Anatomía y de Embriología y ² Unidad de Bioestadística, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Con el fin de analizar los patrones de proliferación celular de los mesénquimas del tabique uorrectal (TUR) y de los territorios adyacentes (mesénquima urogenital posterior, mesénquima intestinal anterior y mesénquima de los pliegues cloacales) y su contribución en el proceso de división de la cloaca, se han dibujado mediante cámara lúcida los contornos nucleares de 3874 células mesenquimatosas en cortes seleccionados de embriones humanos (estadios Carnegie (ECs) 13 a 18). Basándonos en los cambios de tamaño de los núcleos durante el ciclo celular, hemos considerado células proliferantes de cada territorio a aquellas con el área nuclear por encima del percentil 75. El URS mostró una proliferación celular creciente, con patrones de proliferación muy coincidentes con el mesénquima de los pliegues cloacales y globalmente con menor proliferación celular que los mesénquimas urogenital e intestinal. Además hemos observado en el EC 18 el comienzo de la rotura de la membrana cloacal, pero no se ha demostrado fusión ni entre el TUR y la membrana cloacal ni entre los pliegues cloacales. Los resultados sugieren que la división de la cloaca depende de un complejo morfogénico donde los territorios adyacentes pueden determinar el desplazamiento septal al tiempo que sus mesénquimas pueden ser parcialmente incorporados a un TUR en proliferación.

La eliminación de la regulación por miRNA del gen INCURVATA4 de *Arabidopsis thaliana* altera el patrón vascular del tallo.

Isabel Ochando, Antonio Vera y Antonio Martínez-Laborda

División de Genética. Universidad Miguel Hernández de Elche. Campus de Sant Joan d'Alacant. Ctra. de Valencia s/n. 03550-Sant Joan d'Alacant.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs que regulan postranscripcionalmente la expresión génica. Recientemente, se han aislado en *Arabidopsis thaliana* varios miRNAs que regulan a genes implicados en el desarrollo vegetal¹. Los miRNA165 y miRNA166 regulan la expresión de genes de la familia de factores de transcripción HD-ZIP III (homeodomain/leucine zipper III)². Esta familia comprende cinco miembros: PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV) y REVOLUTA (REV), que se expresan en los dominios adaxiales de órganos laterales, en el meristemo apical y en tejidos vasculares, y ATHB-8 y ATHB-15, que parecen expresarse exclusivamente en tejidos vasculares³. Existen mutaciones de ganancia de función en los tres primeros genes, situadas en la secuencia diana de los miRNA, que al eliminar la regulación postranscripcional determinan la aparición del ARNm en los dominios abaxiales.

Anteriormente, descubrimos una mutación puntual, en la secuencia diana de miRNA165/166 del gen ATHB-15, al que denominamos INCURVATA4 (ICU4). El alelo semidominante *icu4-1* produce un fenotipo parcialmente adaxializado, consistente en hojas incurvadas, y la alteración del patrón vascular del tallo. Éste consta en el silvestre de 8 fascículos con patrón colateral (el xilema ocupa una posición central y el floema queda en una zona más periférica), que en el mutante *icu4-1* quedan reducidos a 5 ó 6. Estudios recientes han evidenciado la correlación entre los ejes adaxial-abaxial y central-periférico de órganos con simetría bilateral y radial, respectivamente, y la participación de los genes HD-ZIP III en el establecimiento y/o el mantenimiento de dichos ejes³. Los dobles mutantes para la mutación *icu4-1* y alelos de genes de la familia HD-ZIP III (*phb-1D*), de naturaleza abaxial (*fil-3*) o que participan en la regulación de los miRNA (*hst-1*) presentan fenotipos de extrema reducción en el número de fascículos del tallo y/o la aparición de un patrón anfivasal (el xilema aparece rodeando al floema). En su conjunto, los datos indican que la regulación precisa de la expresión localizada de los genes HD-ZIP III es esencial para la formación del patrón correcto de haces vasculares en el tallo.

REFERENCIAS

1. Reinhardt BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16: 1616-1626.
2. Tang G, Reinhardt BJ, Bartel DP y Zamore PD (2002). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17: 49-63.
3. Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL Radial Patterning of *Arabidopsis* Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes (2003). *Curr Biol* 13:1768-1774.

Endoderm Patterning in *Xenopus laevis*

Ricardo Costa

University of Cambridge

The endoderm is the inner germ layer of the vertebrate embryo from which the respiratory and digestive systems are derived. These include organs such as the liver, pancreas, stomach, lungs and intestine. Recent research has helped our understanding of early vertebrate endoderm specification and terminal differentiation of specific endodermal lineages. However, very little is known about the molecular mechanisms that control endoderm patterning and morphogenesis during vertebrate development.

As a way to identify genes involved in these elusive steps of development, I performed a differential hybridisation screen on a macroarray tailbud ventral foregut cDNA library coupled with *in situ* hybridisation analysis. My aim was to identify and characterise new regionally expressed endodermal genes in *Xenopus laevis*, a classical embryologic model organism.

Here, I report the identification and characterisation of a dozen novel regionally expressed endoderm genes. At tailbud stages their expression patterns fall into three re-occurring domains; anterior ventral midgut endoderm, posterior endoderm and dorsal endoderm. In addition, regional expression of some of these genes is observable at gastrula stages, during endoderm specification. These are the first early stable endodermal markers for different regions of the gastrula endoderm. This suggests that the earliest steps in endoderm patterning are concurrent with endoderm specification.

Overall, these results reveal an unexpected degree of early endodermal patterning and assist our understanding of the link between early and late events of vertebrate endoderm development. In addition, this work provides us with new and very useful markers for endodermal patterning, and potentially some key developmental regulators of endodermal formation.

OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS CON SOBREPRESIÓN DEL GEN DE CALCITONINA EN LA REGIÓN MÁS DORSAL DEL TUBO NEURAL

Jesús Canudas, Pedro Muniesa, Víctor Sorribas, Hassnae Badi, Ana M. Lacosta, Julia Catalán, Salvador Climent y Manuel Sarasa.

Laboratorio de Neurobiología, Universidad de Zaragoza.

La calcitonina es una hormona que interviene en la homeostasis del calcio. Es producida, tras el procesamiento proteolítico de su precursor, por las células C del cuerpo ultimobranquial en aves y del tiroides en mamíferos. En los últimos años, se ha detectado la presencia de calcitonina en tejidos diferentes a la glándula ultimobranquial o al tiroides, especialmente en el sistema nervioso central. Nuestro laboratorio encontró expresión del gen de calcitonina en las células de la placa del suelo del tubo neural durante el desarrollo embrionario del pollo, así como en el techo del diencefalo en el embrión de rata. La función de la calcitonina, o su precursor, en estas nuevas localizaciones es desconocida. Con el fin de averiguar el posible papel de la calcitonina o su precursor en el desarrollo, hemos generado ratones transgénicos con el cassette de expresión del gen Wnt-1 para que se sobreexpresen la proteína en la parte dorsal del tubo neural. Tenemos establecidos dos linajes transgénicos en los que se detecta la presencia del ARNm del transgén en la región más dorsal del tubo neural. Actualmente estamos analizando, mediante hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, las posibles modificaciones que puedan existir en el patrón de diferenciación del tubo neural del embrión.

Evolución de la placenta y el trofoblasto en vertebrados

Susana Cañón y Miguel Manzanares.

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), Madrid.

La placenta es el órgano responsable del intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho entre la madre y el embrión durante el embarazo. El trofoblasto es el principal tipo celular placentario y es un carácter exclusivo de mamíferos. A pesar de su papel vital durante el desarrollo embrionario se conoce muy poco acerca del control de la formación de la placenta y el trofoblasto y menos, acerca de su evolución y aparición en la base del linaje de los mamíferos. En vertebrados no placentarios como el pollo, existe una especialización de las membranas extraembrionarias para llevar a cabo la absorción de los nutrientes presentes en la yema y pasarlos al embrión. En algunos reptiles y peces se ha descrito la existencia de una placenta responsable del intercambio de nutrientes entre la madre y el embrión. Sin embargo, en ninguno de estos casos se puede encontrar una estructura similar a la placenta invasiva derivada del trofoblasto presente en mamíferos. A pesar de esto, es posible que parte del programa genético implicado en el desarrollo de la placenta de mamíferos pueda estar presente en estos órganos de otras especies de vertebrados, lo que sería indicativo de la existencia de un precursor evolutivo del trofoblasto. La búsqueda de homólogos de los genes implicados en el desarrollo de la placenta de mamíferos en vertebrados no placentarios y el análisis de su expresión en sus estructuras extraembrionarias, constituyen el primer paso en la reconstrucción de la historia temprana de la evolución de la placenta. Entre los factores codificados por algunos de estos genes, se encuentran miembros de la familia de los bHLH (*Hand1*, *Ascl2*), factores zinc finger (*Snail*), factores pertenecientes a la familia de los FGFs (*Fgf4*, *Fgfr2*) o miembros de la familia GCM (*Gcm1*). Nosotros hemos comenzado el análisis de la expresión de estos genes a lo largo del desarrollo temprano del embrión de pollo mediante hibridación *in situ* centrando la atención en las membranas extraembrionarias.

INTERACCIÓN ENTRE LA RUTA DE DPP Y LA ACTIVINA

Juanas Melero, David y García-Bellido Antonio.

Laboratorio de Genética del Desarrollo, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"/CSIC, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, SPAIN

Las citoquinas de la superfamilia TGF-beta actúan como reguladoras del crecimiento celular, la diferenciación y la morfogénesis (Derynck and Feng, 1997). Basándonos en la similitud de secuencias las moléculas de familia TGF-beta se pueden dividir en dos tipos diferentes, las BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) y las Activinas. Ambos parecen tener similares mecanismos de señalización (Heldin et al., 1997), llegando a compartir elementos en el proceso de señalización: el receptor de Tipo II Punt, y la Co-Smad Medea. Experimentos previos indican que el papel de la ruta de la Activina afecta la proliferación, pero no al patrón morfogénico (Brummel et al., 1999). La señalización de ambas rutas concluiría con la formación de dímeros en el citoplasma que se forman al ser fosforilada la R-Smad por su receptor de tipo II (Attisano and Wrana, 2000; Hudson et al., 1998). Estos dímeros pasarían al interior del núcleo donde se unirían al DNA, activando o reprimiendo la expresión de genes.

Nuestro estudio de la expresión del mRNA del receptor de tipo II Baboon (Babo) en los discos imaginales revela que en el disco de ala este gen se expresa por todo el territorio presuntivo del ala propia y parte del notum pero no en zonas axilares. La sobreexpresión en clones de la forma activada de Babo donde no se está expresando causa un aumento de la proliferación. En cambio, dentro de su dominio de expresión las células que lo sobreexpresan causan alteraciones en la correcta expresión de genes de la ruta de las BMPs. Aumentan el dominio de expresión de Dpp y disminuyen la cantidad de proteína Mad que se encuentra fosforilada. Finalmente son eliminadas de estos territorios por apoptosis. Sorprendentemente los niveles de expresión de Thickvein (Tkv) y Spalt no están modificados.

Así la ruta de la Activina controlaría la señalización de las BMPs mediante el establecimiento de equilibrios en la cantidad de proteínas SMADs disponibles en el citoplasma para formar dímeros. Cuando desplazamos el equilibrio aumentando la ruta de la Activina estamos alterando la integridad de la señalización de la ruta de las BMPs. Esto sugiere que en el paisaje celular del patrón de expresión de genes, el equilibrio entre ambas rutas de señalización está sutilmente controlado por la actividad relativa de las dos rutas BMP y Activina.

Neutralization of soluble, foetal, and dam-foreign antigens: anatomical and histological effects

Luis Juárez and Antonio Rodríguez-Burgos

Unidad de Fetoproteínas. Campus Universitario. Universidad de Córdoba.

This study looks into the teratogenic effects of antiembryonic and antipaternal antibodies on a 57 hour old chick embryo. These antibodies are induced by immunising the hens with an extract of chick embryo that has been incubated for 53 hours, which contains soluble dam-foreign transitory antigens as well as soluble alloantigens. The teratogenic effects observed in the embryo were extensive and diverse. The histological study detected cellular disintegration in the prosencephalon cells, and abnormalities in the infundibulum. Some blood islands and somites showed papilliform cells. The neural crest cells cross the neural tube through the joint, at the level of mesencephalon and rhombencephalon, and protrude into its light. The slackness of the mesenchymal tissue is related to the scoliosis observed in the offspring of one of these hens, and the protrusion with the transitory neurological disorders observed in other chicks of the same hens (Rodríguez Burgos et al., 2004).

LISTADO DE PARTICIPANTES

Abelló Gina	CEXS,UPF	gina.abello@upf.edu
Alonso Hugo	Universidad Miguel Hernandez de Elche Alicante	hugoacb@umh.es
Alvarez Carmen	Centre de Biologie du Developpement. Toulouse	carmen.alvarez@wanadoo.es
Andrades José Antonio	Fac. de Ciencias,Universidad de Malaga	andrades@uma.es
Angulo Mireia	Universidad de Barcelona	mangulo@ub.edu
Aragón Ferran	Universidad Pompeu Fabra.Barcelona	ferran.aragon@upf.edu
Aranega Amelia	Dpto de Biología Experimental Universidad de Jaen	aaanega@ujaen.es
Arechaga J.	Dpto de Biología Celular Universidad del Pais Vasco	gcparmaj@lg.ehu.es
Baena Luis A.	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.UAM	abaena@cbm.es
Baguña, Jaume	Universidad de Barcelona	jbaguna@ub.edu
Barbas Julio Alberto	Instituto Cajal CSIC	jbarbas@cajal.csic.es
Bardet Sylvia	Laboratorio de Anatomia Humana y Psicobiologia .Facultad de Medicina. Murcia	sbardet@um.es
Barrio Olano Rosa	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. UAM Cantoblanco Madrid	rbarrio@cbm.uam.es
Bastida de la Calle M ^a Felix	Dpto.Anatomia y Biología Celular.Universidad de Cantabria	uc19003@alumnos.unican.es
Becerra José	Dpto.Biología Celular Fac. Ciencias Universidad de Malaga	becerra@uma.es
Beltran Agullo Sergi	Departament de Genètica, Universitat de Barcelona	beltran@ub.edu]
Blanco M ^a José	Dpto.Anatomia y Embriología Humana I Universidad Complutense de Madrid	mjblanco@med.ucm.es
Boutet Agnes	Instituto Cajal,CSIC	Agnes.boutet@cajal.csic.es
Bovolenta,Paola	Instituto Cajal, CSIC	bovolenta@cajal.csic.es
Bras Catarina	Cento Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide.Sevilla	cabrasim@cabd.upo.es
Bueno David	Dpto.de Genetica Universidad de Barcelona	dbueno@ub.edu
Cabello Pardos Juan	Institute of Genetics,technical university of Braunschweig	jcabello@tu-bs.de
Canudas Jesús	Fac. de Veterinaria.Universidad de Zaragoza	127506@docto.unizar.es
Cañon Sanchez Susana	Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM	scanon@iib.uam.es
Casafont Iñigo	Universidad de Cantabria	inigo.casafont@alumnos.unican.es
Casares Fernando	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	fcasfer@cabd.upo.es
Castelli James	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	jcashom@cabd.upo.es
Cayuso Jordi	CSIC/PCB	jcmbmc@cid.csic.es
Cerda Olmedo Enrique	Departamento de Genética Universidad de Sevilla	eco@us.es
Chimal Monroy Jesus	Universidad Autónoma de Mexico	jchimal@servidor.unam.mx
Claveria Izquierdo Cristina	Dpto de Inmunología y Oncología.Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autonoma ,Cantoblanco Madrid	cclaveria@cnb.uam.es
Cobrerros Laura	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	lcobreg@cabd.upo.es
Coll Montse	Universidad Pompeu Fabra Barcelona	Montse.coll@upf.edu
Corominas Montserrat	Universida de Barcelona. Dpto. Genetica	mcorominas@ub.edu
Costa Ricardo	University of Cambridge. U.K:	rmcb2@cam.ac.uk
Couso Tapia Juan Pablo	University of Sussex	j.p.couso@sussex.ac.uk
Cruz Rubio Cristina	Centro de Bilogia Molecular Severo Ochoa Cantoblanco Madrid	ccruz@cbm.uam.es
Cubas Pilar	Centro de Bilogia Molecular Severo Ochoa Cantoblanco Madrid	pcubas@cnb.uam.es

De la Mano Aníbal	Facultad de Medicina Universidad de Valladolid	
De la Pompa Mínguez Jose Luis	Dpto.de Inmunología y Oncología Centro Nacional de Biotecnología,CSIC Campus Cantoblanco Madrid	jlpompa@cnb.uam.es
De Navas Luis	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa(CSIC-UAM)Madrid	lfdenavas@cbm.uam.es
Del Pico Ana M ^a	Zentrum für Molekulare Neurobiologie,Universitae Hmburg	ana-maria.delpicoausin@zmnh.uni-hamburg.de
Delgado Fumero Ana Cristina	Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna	anacrdelgado@yahoo.es
Dichtel-Danjoy Marie-Laure	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	mlaudic@cabd.upo.es
Diego Franco Jaime	Dpto.de Biología Experimental Universidad de Jaen	dfranco@ujaen.es
Diez Alejandro	Universidad del Pais Vasco	alexdtorre@yahoo.es
Domínguez Luis	Facultad de Veterinaria Zaragoza	luisdom@posta.unizar.es
Echevarria Diego	Instituto de Neurociencias.Univ Miguel Hernandez de Elche.Alicante	diegoaza@umh.es
Félix Elena	Dpto.de Morfología.Universidad de Las Palmas de Gran Canaria	elena.felix101@doctorandos.ulpgc.es
Fernandez Miñán Ana	CSIC.Centro Andaluz de Biología del Desarrollo.Universidad Pablo de Olavide	amfermin@cabd.upo.es
Fernández Terán Marian	Dpto.Anatomía y Biología Celular.Universidad de Cantabria	fernandta@unican.es
Fogarty David	The Internacional Journal of Developmental Biology	ijdb@lg.ehu.es
Franch Marro Xavier	Nacional Institute for Medical Research Mill Hill. London	xfranch@nimr.mrc.ac.uk
Gallego Jabier	IGBMC	Javier@igbmc.u-strasbg.fr
Gañán Yolanda	Dpto de Anatomía Humana Universidad de Extremadura	yolandag@unex.es
Garcia Arques Carlos	Centro Nacional de Biotecnología.Campus de Cantoblanco Madrid	cgarcia@cnb.uam.es
García Bellido Antonio	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM Cantoblanco Madrid	gbellido@correo.cbm.uam.es
Garcia Fernandez Beatriz	Gulbenkian. Portugal	beatrizf@igc.gulbenkian.pt
García Jordi	Universidad de Barcelona	jgarcia@bio.ub.es
Garcia Porrero J.A.	Dpto. Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria	garciaja@unican.es
García-Campmany Lidia	Instituto de Biología Molecular Parc Científic de Barcelona	lgcbmc@ibmb.csic.es
García-Martínez Virginio	Dpto.Anatomía Humana Universidad de Extremadura	virginio@unex.es
Gato Angel	Dpto de Anatomía y Radiología Universidad de Valladolid	gato@med.uva.es
Giraldez Fernando	Universidad Pompeu Fabra Barcelona	Fernando.giraldez@upf.edu
González Reyes	CSIC.Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	agr@ipb.csic.es
Gonzalez-Gaitan Marcos	MaxPlank Institut. CBG.Dresden	gonzalez@mpi-cbg.de
Gorospe Itziar	Instituto de Investigaciones Biomedicas "Alberto Sols"CSIC-UAM	igorospe@iib.uam.es
Grego Bessa Joaquín	Dpto. de Inmunología y Oncología Centro Nacional de Biotecnología,CSIC Campus Cantoblanco Madrid	jgrego@cnb.uam.es
Hernández Victor	Dpto Genetica. Univ. Barcelona	victorhernandez@ub.edu
Herrera Pedro	Department of Morphology Universidad de Geneve	pedro.herrera@medecine.unige.ch

Herranz Hector	Universitat de Barcelona.	jhherranz@pcb.ub.es
Hurle Juan M	Departamento de Anatomía y Biología Celular. Univ. Cantabria	hurlej@unican.es
Izpisua Belmonte Juan C	Salk Institut. La Jolla. California	belmonte@salk.edu
Jiménez Lucía	Dpto. Biología Celular e Histología Facultad de Medicina y Oncología Universidad del País Vasco	gcpunrof@ehu.es
Juanas David	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa Universidad Autónoma de Madrid	djuanas@cbm.uam.es
Juarez Martín Luis	Universidad de Córdoba	miljuma@uco.es
Lacosta Ana M ^a	Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza	alacosta@unizar.es
Lioubinski Oleg	Centre for Molecular Neurobiology Hamburg	oleg.lioubinski@zmnh.uni-hamburg
López Lourdes	CSIC. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide	lloponi@cabd.upo.es
López Marisa	Dpto. Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria	marialuisa.lopez@unican.es
López-Sánchez Carmen	Dpto de Anatomía Humana Universidad de Extremadura	clopez@unex.es
Lorente Beatriz	Dpto. de Anatomía Humana. Universidad de Murcia	bealc@um.es
Macias Domingo	Dpto de Anatomía Humana Universidad de Extremadura	yolandag@unex.es
Manzanares Miguel	Instituto de Investigaciones Biomedicas, CSIC-UAM Madrid	mmanzanares@iib.uam.es
Martin Llorente Cristina	Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid	cristina@med.uva.es
Martínez Arias Alfonso	University of Cambridge. U.K:	ama11@cus.cam.ac.uk
Martínez Concepción	Universidad Complutense de Madrid	cmartinez@med.uvm.es
Martínez Laborda Antonio	Universidad Miguel Hernández de Elche Alicante	laborda@umh.es
Martínez Salvador	Instituto de Neurociencias. Universidad Miguel Hernández. Alicante	smartinez@umh.es
Mikhailov Alexander	Universidad de La Coruña	margot@udc.es
Milan Marco	Institut de Recerca Biomedica. PCB. Univ. Barcelona	mmilan@pcb.ub.es
Minguillon Gil Carolina	National Institute for Medical Research. Mill Hill. London	cmingui@nimr.mrc.ac.uk
Modolell Juan	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM Cantoblanco Madrid	jmodol@cbm.uam.es
Molnar Cristina	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM Cantoblanco Madrid	cmolnar@cbm.uam.es
Montero Simon Juan A	Max-Planck-Institute of Molecular Cell Biology and Genetic. Germany	montero@mpi-cbg.de
Morales Aixa	Instituto Cajal	aixamorales@cajal.csic.es
Morata Gines	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM Cantoblanco Madrid	gmorata@cbm.uam.es
Moro José A.	Facultad de Medicina Universidad de Valladolid	moro@med.uva.es
Mullor Jose Luis	Instituto Cajal CSIC. Madrid	mullor@cajal.csic.es
Muñoz Chapuli	Dpto de Biología Animal Universidad de Málaga	chapuli@uma.es
Muñoz Silvia	Dpto. Genética Fac. CC. Biológicas Universidad de Valencia	silvia.munoz@uv.es
Nacher Victor	Dpto. de Sanidad y Anatomía Animales Universidad Autónoma de Barcelona	victor.nacher@uab.es

Navarro Marc	Dpto.de Sanidad y Anatomia Animales.Universidad Autonoma de Barcelona	marc.navarro@uab.es
Navascues Ortega Joaquin	Dpto.Anatomia y Biología Celular.Universidad de Cantabria	navascuj@unican.es
Nebot Cegarra Joseph	Departament de Ciències Morfològiques.Universitat Autonoma de Barcelona	Joseph.Nebot@uab.es
Nieto Angela	Instituto Cajal. CSIC. Madrid	anieto@cajal.csic.es
Parada Borja Carolina	Departamento de Genética. Universidad de Barcelona	cparada@ub.edu
Paricio Nuria	Dpto.de Genetica fac CC. Biologicas Universidad de Valencia	nuria.paricio@uv.es
Pearson John	CSIC.Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide.Sevilla.Sevilla	jrobpea@cabd.upo.es
Pujades Cristina	Universidad Pompeu Fabra.Barcelona	cristina.pujades@upf.edu
Rabadán Mª Angeles	Dpto.Anatomia y Embriología I Universidad Complutense de Madrid	angierlozano@hotmail.com
Ribeiro Jose Carlos	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide.Sevilla	jrribbes@cabd.upo.es
Ríos Iria	CSIC Parc Científic de Barcelona	irribmc@cid.csic.es
Ripoll Juan José	Dpto de Biología Aplicada Universidad Miguel Hernandez de Elche Alicante	jjripoll@umh.es
Rodríguez Guzman Maria	Departamento de Anatomia y Biología Celular. Universidad de Cantabria	maria_rodriguez_guzman@hotmail.com
Rodríguez Tristan	MRC Clinical Sciences Centre.Imperial Collage London Hammersmith Hospital Campus London W120NN. UK	tristan.rodriguez@csc.mrc.ac.uk
Rojo Concepción	Dpto.de Anatomia y Anatomia Patologica Universidad Complutense de Madrid	rojosalv@vet.ucm.es
Ros Lasiera Marian	Departamento de Anatomía y Biología Celular. Univ. Cantabria	rosm@unican.es
Ruberte Jesús	Dpto. de Sanidad y Anatomia Animal Universidad de Barcelona	Jesús.ruberte@blues.uab.es
Ruiz González José María	Instituto Cajal. Doctor Arce 37. Madrid.	jmruiz@cajal.csic.es
Sarasa Manuel	Laboratorio de Neurobiología Universidad de Zaragoza	sarasa@unizar.es
Schimmang Thomas	ZMNH, UKE. Alemania	schimman@zmnh.uni-hamburg.de
Silvan Unai	Dpto.Biología Celular e Histología Facultad de Medicina y Oncología Universidad del País Vasco	unaii@spymac.com
Sousa Paulo	Instituto de Biología Molecular e Celular y Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide.Sevilla	paulop@ibmc.up.pt
Stern Claudio	Dpto. Anatomy and Dev. Biology University Collage London.UK	c.sterneucl.ac.uk
Talamillo Ana	Dpto.Anatomia y Biología Celular.Universidad de Cantabria	talamila@unican.es
Terán Villagrà Nuria	Departamento de Anatomia y Biología Celular. Universidad de Cantabria	nuriateran@hotmail.com
Terriente Felix Javier	CBM-SO.Facultad de Ciencias. UAM. Cantoblanco	jterriente@cbm.uam.es
Torre Perez Nuria	Departamento de Anatomia y Biología Celular. Universidad de Cantabria	torren@unican.es
Torres de Pinho Carla Sofia	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide	cstorpin@cabd.upo.es
Trujillo Carmen	Dpto.Microbiología y Biología Celular.Universidad de La Laguna	mctrujil@ull.es
Ulloa Encarna	Universidad Pompeu Fabra.Barcelona	encarna.ulloa@upf.edu

Unda Fernando	Dpto. Biología Celular e Histología Facultad de Medicina y Oncología Universidad del País Vasco	gcpunrof@ehu.es
Urbano J.M ^a	Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide. Sevilla	jmurbfer@cabd.upo.es
Vázquez Citlali	Universidad Pompeu Fabra. Barcelona	Citlali.vazquez@upf.edu
Vera Tornel Antonio	División de Genética Universidad Miguel Hernández de Elche Alicante	avera@umh.es
Vieira Claudia	Instituto de neurociencias. Univ. Miguel Hernández de Elche. Alicante	claudialima@umh.es
Zelarayan Laura	Centre for Molecular Neurobiology Hamburg. Germany	Laura.cecilia.zelarayan@zmnh.uni-hamburg.de
Zuzarte Vanessa	Departamento de Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria	vanessa-alexandra.zuzarte@alumnos.unican.es

PATROCINADORES

**AYUNTAMIENTO DE SANTANDER
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA
CONSEJERÍA DE EDUCACIÓN
BANCO SANTANDER CENTRAL HISPANO
DEVELOPMENTAL DYNAMICS
EDITORIAL PANAMERICANA
OLYMPUS**