

XIV REUNIÓN GRUPO MICROBIOLOGÍA MOLECULAR



Santander 2024

LIBRO DE COMUNICACIONES





SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
MICROBIOLOGÍA

XIV REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SEM

Santander, 17-19 de junio de 2024



Patrocinadores:



Comité Organizador

Raúl Fernández López
IBBTEC, CSIC

Félix Sangari García
IBBTEC, Universidad de Cantabria

Marta Robledo Garrido
IBBTEC, Universidad de Cantabria

Mapi Garcillán Barcia
IBBTEC, CSIC

Santiago Redondo Salvo
IBBTEC, Universidad de Cantabria

Yelina Ortiz Pérez
IBBTEC, CSIC

Comité Científico

Alicia M. Muro Pastor
IBVF, CSIC-Universidad de Sevilla

**José Antonio Escudero
García-Calderón**
Universidad Complutense de Madrid

**María Trinidad Gallegos
Fernández**
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

Francisco Ramos Morales
Universidad de Sevilla

**Carmen del Rosario Beuzón
López**
Universidad de Málaga

Bruno González Zorn
Universidad Complutense de Madrid

Jesús A. Gonzalo Asensio
Universidad de Zaragoza

Álvaro San Millán Cruz
CNB, CSIC

Alejandro Toledo Arana
IdAB, CSIC

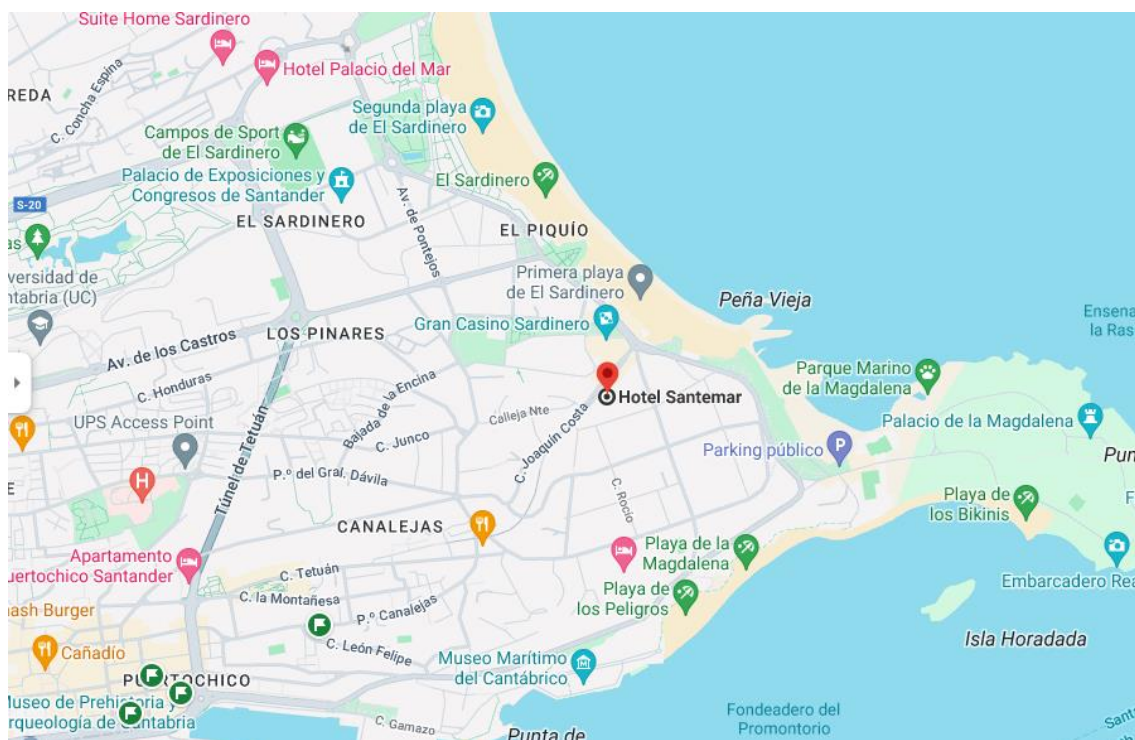
Eduard Torrents Serra
Universidad de Barcelona

Información práctica

Sede de la Reunión

Todas las sesiones y actividades tendrán lugar en el Hotel Santemar, Calle Joaquín Costa, 28, 39005 Santander, Cantabria.

<https://www.hotelsantemar.com/es/>



Conferencias y comunicaciones orales

Todas las conferencias y comunicaciones orales se realizarán en el **Salón Convención** del Hotel Santemar.

Pósters

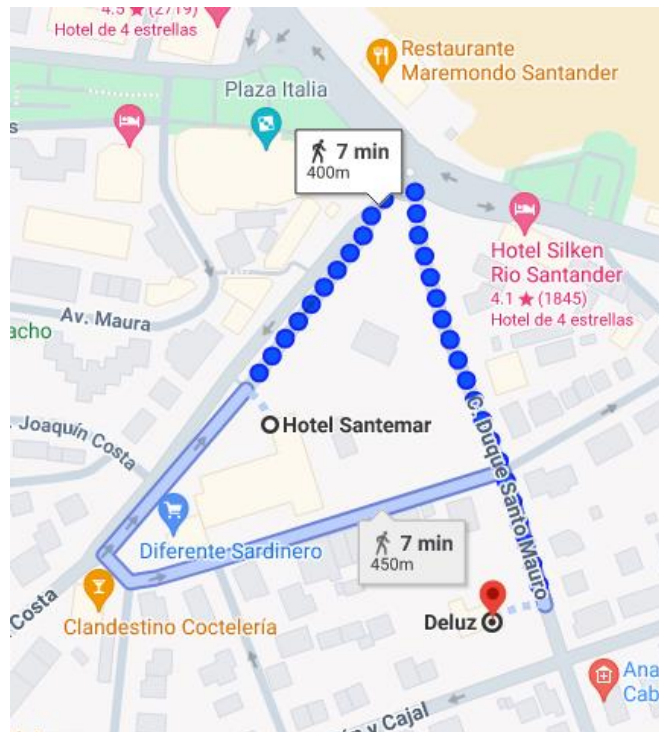
En el Programa de la Reunión, cada comunicación (orales y pósters) lleva asociado un número (Pn) que corresponde con el panel en el que se instalará el poster correspondiente. Los posters se instalarán en las **Salas Murcia y Granada** del Hotel Santemar.

Cocktail de bienvenida

El cocktail de bienvenida tendrá lugar en la **terraza** del Hotel Santemar.

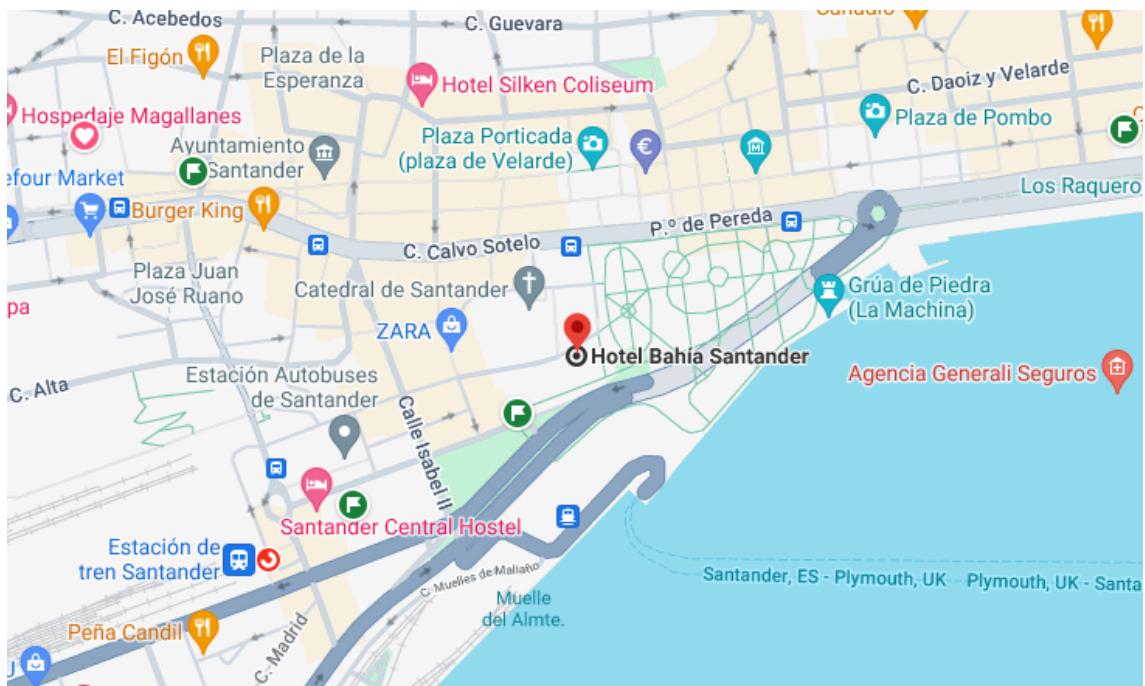
Comidas

Las comidas consistirán en un buffet en el **Restaurante Deluz**, Calle Ramón y Cajal, 18, 39005, Santander, Cantabria.



Cocktail de despedida

El Cocktail de clausura tendrá lugar en el **Hotel Bahía**, Calle Cádiz, 22, 39002, Santander, Cantabria.



XIV REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Santander, 17-19 de junio de 2024

Programa

Lunes, 17 de junio de 2024

14:00 Entrega de documentación y colocación de paneles

16:00 Inauguración y Conferencia de apertura

Predicting the function of synthetic microbial communities

Alvaro Sanchez

IBFG-CSIC Salamanca

Sesión I: Comunidades microbianas

Moderadores: Junkal Garmendia, Instituto de Agrobiotecnología-CSIC

Rafael Giraldo, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

17:15 Análisis del efecto de los amiloides de la microbiota sobre la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica.
Ainara Aginaga, Miriam Serrano, Alejandro Toledo-Arana, Macarena Sanchez, Jaione Valle - P2

17:30 La Dieta Afecta A La Efectividad Del Trasplante Fecal Como Terapia Frente A Patógenos Multirresistentes.
Ángel Ruiz-Moreno, Beatriz Herrera, Anna Quirant, María José Garzón, Antonio Pineda-Lucena, Nuria Gómez-Cebrián, Leonor Puchades-Carrasco, Carles Úbeda - P135

17:45 Bacterial responses to complex mixtures of environmental resources exhibit simple patterns.
Andrea Arrabal, Magdalena San Román, Juan Díaz-Colunga, Álvaro Sánchez - P13

18:00 The use of bacterial consortia isolated from WWTPs for ibuprofen bioremediation: a solution to the problem of emerging contaminants.
Pilar Navarro-Gómez, Zaki Saati-Santamaría, Juan A. Martínez-Mancebo, Maitane Juárez-Mugarza, Amando Flores and Inés Canosa - P106

18:15 Café

Sesión II: Microbiología Molecular

Moderadores: Ignacio Luque Romero, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla

Francisca Reyes Ramirez, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD/CSIC), Junta de Andalucía, Universidad Pablo de Olavide (UPO)

- 19:00 Identificación de proteínas de unión a RNA involucradas en fenómenos de diferenciación celular en cianobacterias.
Manuel Brenes-Álvarez, Halie Rae Ropp, Frank Stein, Dimitrios Papagiannidis, Clement Potel, Mikhail Savitski, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor, Wolfgang Hess - P30
- 19:15 Interpretable regulatory motifs incorporating flexible elements and DNA structural features.
Elia Mascolo, Quinn Mood, Erik Blázquez Fernández, Álex Velasco Cañete de Cardenas, Raúl Gómez Buisan, Ivan Erill - P50
- 19:30 An experimental study of the D-glutamate racemase activity in the uncultivated CPR bacterium *Saccharimonas aalborgensis*.
Marcos Peñalver, Alberto Paradela, César Palacios-Cuéllar, M. Graciela Pucciarelli, Francisco García-del Portillo - P113
- 19:45 conAn, un nuevo sistema de antiterminación procesivo asociado a la expresión de los genes de conjugación en muchos de los plásmidos conjugativos de bacterias Gram +.
Andrés Miguel-Arribas, Fernando Rojo, Wilfried JJ Meijer - P99
- 20:00 Regulación del ensamblaje de flagelos polares en *Pseudomonas putida*.
Marta Pulido-Sánchez, Antonio Leal-Morales, Aroa López-Sánchez, Felipe Cava, Fernando Govantes - P122

20:30 Cocktail

Martes, 18 de junio de 2024

Sesión III: Resistencia a los antimicrobianos

Moderadores: Matxalen Llosa, Universidad de Cantabria (UC)

Jaione Valle, Instituto de Agrobiotecnología (IdAB)-CSIC

- 9:00 Epidemiología molecular de BLEEs en un entorno *One Health*.
Javier F Favieres, Jose F Delgado-Blas, Carlos Serna, Mario Pulido-Vadillo, Bosco R Matamoros, Natalia Montero, Rafel Bazán, Teresa Blanco Cacho, Miguel Ángel Pezzi, Ulises Ameyugo, Rocío Fernández Urrusuno, Bruno Gonzalez-Zorn - P53
- 9:15 Papel de la metilación del ADN en la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli*.
Fernández-Fernández Rocío, Sánchez-Romero María Antonia - P54

- 9:30 La anaerobiosis modula la función de los genes de resistencia.
Laura Ortiz, Amalia Prieto, Alberto Hipólito, Nicolas Kieffer, Ester Vergara, José Antonio Escudero - P108
- 9:45 Engineering phagemids to tackle plasmid-mediated antibiotic resistance.
Ada Muñoz-Cazalla, Laura Álvaro-Llorente, Laura Jaraba-Soto, Ana Elena Pérez-Cobas, Cristina Herencias, Jerónimo Rodríguez-Beltrán - P102
- 10:00 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Spain involve rare and complex resistance plasmids and ST lineages.
Sandra Martínez-Álvarez, Pierre Châtre, Pauline François, Myriam Zarazaga, Jean-Yves Madec, Marisa Haenni, Carmen Torres - P92
- 10:15 Cross-regulation and signal interference between two Two-Component Systems of *Lactocaseibacillus paracasei* BL23 involved in the response to antimicrobial peptides.
Manolo Zúñiga, Cristina Alcántara, Thorsten Mascher, Ainhoa Revilla-Guarinos - P129
- 10:30 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv is a mutator due to a single SNP in the Noncanonical Mismatch Repair Protein NucS.
Isabel Martín-Blecua, Sonia Gullón Blanco, Esmeralda Cebrián-Sastre, Rafael Prados-Rosales, Alfredo Castañeda-García, Jesús Blázquez - P91

10:45 **Café y posters**

Sesión IV: Mecanismos de virulencia

- Moderadores: Alejandro Toledo Arana, Instituto de Agrobiotecnología (IdAB)-CSIC
Carmen Beuzon Lopez, IHSM (UMA-CSIC)
- 11:45 Lack of RNase HI affects multiple traits associated with virulence in *Salmonella enterica*.
Roberto Balbontín, Julia Jiménez-Espadafor, Gloria Álvarez-Alegre, Joaquín Bernal-Bayard, Francisco Ramos-Morales - P17
- 12:00 Cyclic di-GMP controls virulence and antimicrobial resistance plasmid conjugal transfer in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*.
Rubén de Dios, Lyuboslava Harkova, Ronan R. McCarthy - P41
- 12:15 Regulación de genes de virulencia cromosómicos mediante antiterminación por proteínas codificadas en islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.
Marina Costa, Mercedes Cervera-Alamar, Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Irene Cruz, Guillermo García-Lainez, M^a Ángeles Tormo-Mas - P38

- 12:30 Reinterpretación de datos genómicos mediante biología funcional: El sistema de virulencia PhoPR de *M. tuberculosis*.
Estefanía Crespo-Yuste, Ainhoa Arbués, Jesús Gonzalo-Asensio - P39
- 12:45 tRNA queuosine modification is involved in biofilm formation and virulence in bacteria.
Jorge Díaz-Rullo, José Eduardo González-Pastor - P44
- 13:00 DNA adenine methylation epigenetic control of the FNR transcriptional regulatory network in *Haemophilus influenzae*.
Celia Gil-Campillo, Begoña Euba, Irene Rodríguez-Arce, David San León, Javier Asensio-López, Nahikari López-López, Joshua C. Mell, Gabriel Gutiérrez, Jeroen D. Langereis, María Antonia Sánchez-Romero, Junkal Garmendia - P67
- 13:15 DSF Quorum Sensing regulatory cascade in *Stenotrophomonas maltophilia* coordinates virulence phenotypes through regulation of c-di-GMP levels.
Marc Bravo, Celeste Gómez, Joan-Lluís Pons, Òscar Conchillo-Solé, Xavier Coves, Pol Huedo, Xavier Daura, Isidre Gibert, Daniel Yero - P29

13:30 Comida y posters

Sesión V: Elementos genéticos móviles

- Moderadores: Alvaro San Millan, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).
Bruno Gonzalez-Zorn, Universidad Complutense de Madrid
- 16:00 The non-conjugative plasmids: unveiling the mobility of the supposedly untransmissible.
Manuel Ares Arroyo, Eduardo P. C. Rocha - P11
- 16:15 Conjugative-killer plasmids, a novel antimicrobial alternative.
Pedro Dorado-Morales, Morgan Lamberieux, Didier Mazel - P47
- 16:30 A search for BARs: engineering outer membrane proteins toward the development of Bacterial Antigen Receptors in *E. coli*.
Alejandro Prieto Durán, Álvaro Ceballos-Munuera, Luis Ángel Fernández - P120
- 16:45 Regulación y actividad de un Sistema de Secreción Tipo VI codificado en un plásmido conjugativo.
María del Mar Quiñonero-Coronel, Sheila González-Gutierrez, Fernando de la Cruz, Eric Cascales, M. Pilar Garcillán-Barcia - P126
- 17:00 Antagonistic interactions between phage and host factors control arbitrium lysis-lysogeny decision.
Zamora-Caballero Sara, Cora Chmielowska, Nuria Quiles-Puchalt, Aisling Brady, Francisca Gallego Del Sol, Javier Mancheño-Bonillo, Alonso Felipe-Ruiz, Wilfried J J Meijer, José R Penadés, Alberto Marina - P159

- 17:15 "Tail assembly interference is novel and widespread strategy in prokaryotic immune systems".
Miguel-Romero L, Lingchen H, Alqurainy N, Rocha EPC, Filloi-Salom A, Penadés JR - P100
- 17:30 "El potencial de la conjugación bacteriana en la edición genética de estirpes silvestres. Envío de sistemas CRISPR-Cas por medio de relaxasas".
Dolores L. Guzmán-Herrador, Andrea Fernández-Gómez, Pablo Guridi-Fernández, Silvia Calero, David Bikard, Matxalen Llosa - P75

17:45 **Café y posters**

Sesión VI: Nuevos métodos experimentales

Moderadores: José A. Escudero, Universidad Complutense de Madrid

Alicia Muro Pastor, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. CSIC y Universidad de Sevilla

- 18:45 Engineering membrane vesicles for the development of biopesticides and plant-growth promoting agents.
Javier de la Peña Noya, Adrián Ruíz Camas, Patricia Bernal Guzmán, José Manuel Borrero de Acuña - P27
- 19:00 Exploring bacterial activities from different environments by functional metagenomics.
Luís Andreo-Andreu, Cynthia Alías-Villegas, Sebastián Acosta-Jurado, Alejandro Díaz-Moscoso, Amando Flores, Eva María Camacho - P7
- 19:15 Análisis de los niveles de ATP en cianobacterias en célula individual.
Carlos Diaz-Ceballos, Alfonso Mendaña, Víctor Campa, Daniel E Volke, Pablo I Nikel, Raúl Fernández-López - P43
- 19:30 Evaluación de métodos de screening genómico para la identificación de productores de biosurfactantes y sideróforos en bacterias halófilas moderadas.
Antón T, Arranz A, Franco M, Nieto JJ¹, Vargas C, Salvador M, Argandoña M - P8
- 19:45 Desarrollo de un algoritmo para la identificación y caracterización del excludoma de genomas bacterianos.
Alvaro San Martin, Pablo Iturbe-Sanz, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Iñigo Lasa - P137
- 20:00 Desarrollo y Validación de una Plataforma Microfluídica *Airway-Infection-on-a-Chip* para el Modelado de Infecciones Bacterianas Crónicas.
Carlos Sobejano de la Merced, Marc Riera-Pons, Iván Cortés-Domínguez, Junkal-Garmendia, Carlos Ortiz-de-Solórzano - P146

20:15 Transposon Sequencing Reveals a Novel Sensory System Impacting *Streptococcus suis* Pathogenesis.
Maria Juanpere-Borras, Jos Boekhorst, Blanca Fernandez-Ciruelos, Peter van Baarlen, Jerry Wells - P80

20:30 Cerveza y posters

Miercoles, 19 de junio de 2024

Sesión VII: Interacciones bacteria-hospedador

Moderadores: Jesús Gonzalo-Asensio, Universidad de Zaragoza

Luis Ángel Fernández, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)

9:00 *Streptococcus salivarius* synthesizes and secretes essential amino acids: potential effects on the oral-brain axis.
Adrados-Planell, A., Pascual, J., Revilla-Guarinos, A., Carda-Diéguez M., Vilanova, C., Gimeno, H., Porcar, M., Mira, A. - P1

9:15 Identificación de antígenos de *Candida albicans* reconocidos por IgAs procedentes de intestino de ratón mediante técnicas inmunoproteómicas.
Álvaro, Marina; Blesa, Alba; Prieto, Daniel; Cortés, Isabel; Sanz, Alejandro; García, Lucía; Román, Elvira; Pla, Jesús; Alonso-Monge, Rebeca - P6

9:30 Caracterización del papel de determinantes de virulencia en la interacción *Salmonella*-planta.
Fernando Baisón-Olmo, Nieves López-Pagán, Javier Ruiz-Albert, Carmen R. Beuzón - P16

9:45 Analysis of the *Pseudomonas ogarae* F113 secretome reveals two new type VI secretion systems effectors.
David Vázquez-Arias, David Durán, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla, Marta Martín - P155

10:00 Phylogenetically related *Bacillus* species trigger a differential metabolic shift that drives a shared beneficial response in melon plants.
Carrégalo-Ríos, L.; Molina-Santiago, C; Berlanga-Clavero, MV; Pineda-Dorado, M; Barón-Ayala, M; Dorrestein, P; de Vicente, A; Romero, D - P33

10:15 Uso del sistema de la GFP tripartita en levadura para estudiar la interacción de efectores bacterianos con proteínas implicadas en la respuesta innata humana.
Alejandro Fernández-Vega, Elba del Val, Isabel Rodríguez-Escudero, María Molina, Víctor J. Cid - P58

10:30 Exploring host-pathogen interactions: Unraveling the dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* infection in *Galleria mellonella*.
Júlia Alcàcer-Almansa, Joana Admella, Núria Blanco-Cabra, Eduard Torrents - P3

10:45 **Café y posters**

Sesión VIII: Biología molecular de los patógenos

Moderadores: Jesus Blazquez, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)
Cristina Solano, Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra (UPNA)-Hospital Universitario de Navarra (HUN), IdiSNA

11:45 T6SS de *Salmonella* Typhimurium: en busca del fenotipo perdido.
Isela Serrano-Fujarte, Patricia Bernal, Francisco Ramos-Morales, Joaquín Bernal-Bayard - P21

12:00 Amyloidogenicity and cytotoxicity of Rep-WH1 domains from plasmids in *X. fastidiosa*.
Lucero-López, L., Giraldo, R - P87

12:15 Una nueva mini-proteína induce la formación de agregados extracelulares que atrapan las lipasas de *Staphylococcus aureus*.
Ane Muruzabal-Galarza, Arancha Catalán-Moreno, Pedro Dorado-Morales, Jaione Valle, Alejandro Toledo-Arana - P104

12:30 Sources of stability in $\beta\beta$ -solenoid proteins: pneumococcal choline-binding modules.
Beatriz Maestro; Miguel Saturio-Hornillos; Jesús M. Sanz - P142

12:45 Paving the way to understand the overrepresentation of *Listeria monocytogenes* hypervirulent clones in dairy products.
Carla Palacios-Gorba, Alba Espí-Malillos, Jesús Gomis, Inmaculada López-Almela, Ángel Gómez-Martín, Pilar Ruiz-García, María Carmen López-Mendoza, Francisco García-Del Portillo, M Graciela Pucciarelli, Juan J. Quereda - P110

13:00 **Comida y posters**

16:00 **Clausura y Conferencias Premio Josep Casadesús**

16:45 **Asamblea del Grupo de Microbiología Molecular**

18:00 **Visita turística: Santillana del Mar**

21:30 **Cocktail de despedida- Hotel Bahía**

COMUNICACIONES EN PÓSTER

- P4. Study of effects of cannabinoids on HIV-1 infection. Analysis of their potential anti-latency action and mechanism of action.**
Marcos Alonso Arribas, Luis Miguel Bedoya Del Olmo
- P5. Plasmid-mediated beta-lactam resistance induces collateral sensitivity in *Escherichia coli*.**
Laura Álvaro-Llorente, Cristina Herencias, Laura Jaraba-Soto, Paula Ramiro-Martínez, Ada Muñoz-Cazalla, Álvaro San Millán, Jerónimo Rodríguez-Beltrán
- P10. Genetically engineering *Pseudomonas* strains for T6SS-dependent controlled release of effectors.**
Araujo-Garrido, Mario; Pérez-Lorente, Alicia Isabel; Romero, Diego; Molina-Santiago, Carlos
- P12. Homeostasis del Fe y osmoadaptación: estudio de la red de regulación dependiente de los metaloreguladores Fur en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*.**
Argandoña M, Naranjo E, Torres L, Salvador M, Martínez-Martínez L, Nieto JJ, Vargas C.
- P14. Tryptophan availability and derived metabolites modulate the host-pathogen crosstalk during *Haemophilus influenzae* infection and reveal aryl hydrocarbon receptor as a key contributor.**
Javier Asensio-López, Beatriz Rapún-Araiz, Begoña Euba, David San León, Goizeder Almagro, Celia Gil-Campillo, Saioa Burgui, Juan Nogales, Alejandro Toledo-Arana, Junkal Garmendia
- P15. Deciphering the MirA/CsgD/c-di-GMP network in *Salmonella* biology.**
Leire Azparren, Laura Imedio, Maite Echeverz y Cristina Solano
- P18. New peptidoglycan-related enzyme involved in the early stages of cell division.**
Aitana Belloso, Daniel Ballesteros, Víctor Hernandez-Rocamora, Alessandra Polissi, Waldemar Vollmer, Manuel Pazos
- P19. Conserved patterns in *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome in response to inter-species interactions in wine fermentations.**
Belen Benitez-Dominguez, Sergio Izquierdo-Gea, Javier Ruiz, Alvaro Sanchez, Ignacio Belda
- P20. Aislamiento, caracterización y análisis genómico de bacteriófagos líticos contra *Pseudomonas aeruginosa*.**
Patricia Bernabé-Quispe, Rosa Ana Espada-Zamora, Samara Sabsabi, M^a Del Pilar Marin-Muela, Marina Costa, Irene Cruz y M^a Ángeles Tormo-Mas
- P22. Killing machines in *Pseudomonas putida*: type VI secretion systems and extracellular membrane vesicles.**
Cristina Civantos, Javier de la Peña, Jose Manuel Borrero-de-Acuña, Patricia Bernal

- P24. **Culture media influences *Candida parapsilosis* growth, susceptibility, and virulence.**
Betsy Verónica Arévalo-Jaimes, Joana Admella, Núria Blanco-Cabra, Eduard Torrents
- P28. **Identificación del transportador de metionina de *Streptococcus suis*.**
Camila Bosch, Luis Saralegui, Carla García, Clara Marín, María Pilar Jiménez de Bagüés, Jesús Arenas
- P31. **Efecto de *Salmonella* sobre la biogénesis de ribosomas de células eucarióticas.**
Andrea Bullones-Bolaños, Joaquín Bernal-Bayard, Francisco Ramos-Morales.
- P32. **Reconstruction of the biodegradation pathway of naproxen in microbial consortia by means of metagenomic expression studies.**
Inés Canosa, Juan A. Martínez-Mancebo, Zaki Saati-Santamaría, Pilar Navarro-Gómez, Maitane Juárez-Mugarza, Amando Flores
- P34. **Identificación De Genes Clave Para La Colonización Intestinal Por Enterococos Multirresistentes.**
Gloria Carruana, Alejandra Flor-Duro, Belen Iglesias, Anna Quirant, Javier Pons, Vincent De Maat, Willem Van Schaik, Carles Ubeda
- P35. **La importancia del análisis de células individuales en el estudio de la resistencia a antibióticos.**
Rocío Carvajal-Holguera, María Antonia Sánchez-Romero
- P37. **Molecular and structural insights into the functionality of the quorum-sensing signal synthase RpfF in *Stenotrophomonas maltophilia*.**
Juan Camilo Ortiz, Oscar Conchillo-Solé, Marc Bravo, Joan Lluís Pons, Lucía Sánchez-Alba, Xavier Coves, Andrómeda-Celeste Gómez, David Reverter, Xavier Daura, Daniel Yero, Isidre Gibert
- P40. **Movilización de factores de virulencia codificados en islas de patogenicidad por bacteriófagos endógenos en cepas de *Staphylococcus spp* procedentes de infecciones asociadas a dispositivos médicos.**
Irene Cruz, Marina Costa, Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Mercedes Cervera-Alamar, Amparo Valentín, M^a Ángeles Tormo-Mas
- P42. **When resistance begets resistance: Antibiotic resistance mutations promote bacterial evolvability through an increase in recombination.**
Ignacio de Quinto, Ana-Isabel Rodríguez-Rosado, José R. Valverde, Pablo García, Paula Ramiro-Martinez, Alvaro San Martín, José-Manuel Rodríguez-Martínez, Alvaro Pascual, Jesús Blázquez, and Jerónimo Rodríguez-Beltrán
- P45. **Comparación funcional de los secretomas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 y *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 1448a: identificando estrategias de virulencia y mecanismos de interacción con el huésped.**

Domínguez-Cerván, Hilario; Díaz-Martínez, Luis; Ramos, Cayo; Rodríguez-Moreno, Luis.

- P46. Descifrando el rol del factor sigma *sigC* como sensor de intensidad lumínica en *Synechococcus elongatus* PCC 7942**
Marina Dominguez-Quintero, Alfonso Mendaña, Raquel Gutiérrez-Lanza, Juan Manuel Medina, Víctor Campa, Raúl Fernández-López
- P49. Species-specific regulation of biofilm development in staphylococci is mediated by a small RNA derived from the 3' UTR of *icaR*.**
Maite Echeverz, Saioa Burgi, Amaia Sabalza, Jaione Valle, Iñigo Lasa.
- P52. Identificación de nuevas rutas genéticas que sustentan la función de los telómeros durante gametogénesis.**
Rodrigo Esteban Villafañe, Alfonso Fernández-Álvarez
- P55. Relaxasas conjugativas como vehículo para el envío de sistemas CRISPR-Cas.**
Andrea Fernández-Gómez, Dolores L. Guzmán-Herrador, David Bikard, Matxalen Llosa
- P56. Caracterizando la producción de celulosa por *Starkeya* sp. STN1A a partir de CO₂.**
Fernández-González, Rocío; Pacheco-Sánchez, Daniel; Castillo-Rodríguez, Inés; Martirani-von Abercron, Sophie-Marie; Marín, Patricia; Marqués, Silvia
- P60. La microbiota intestinal facilita la generación de nuevas cepas multirresistentes mediante la transferencia de plásmidos conjugativos.**
Candela Fuster González, Beatriz Herrera, María José Garzón, Asmus Kalckar Olesen, Clara Megías, Blanca Martín, Soren Johannes Sorensen, Carles Ubeda
- P61. Mutaciones naturales en una región rica en adeninas afectan a la producción de un regulador transcripcional de membrana en *Staphylococcus aureus*.**
Coral García-Gutiérrez, Ane Muruzabal-Galarza, Alejandro Toledo-Arana
- P62. ¿*Profilaxia conjugativa*? Nuevos factores de inhibición de la fertilidad contra plásmidos de amplio rango de hospedador.**
Daniel García-López, Sheila González-Gutiérrez, Fernando de la Cruz, M. Pilar Garcillán-Barcia
- P63. Análisis de la evolución que sufren los sistemas de dos componentes para conferir la capacidad de adaptación a nuevos entornos.**
Begoña García, Nahiara Garmendia, Maite Echeverz, Beatriz Álvarez, Luis Ángel Fernandez-Herrero, Iñigo Lasa
- P64. Deciphering the post-transcriptional regulation of the General Stress Response in *Sphingopyxis granuli* TFA.**
Inmaculada García-Romero, Rubén de Dios, Francisca Reyes-Ramírez

- P65. Adaptación de *S. aureus* a factores ambientales en ausencia de TCS.**
Nahiara Garmendia, Begoña García, Maite Echeverz, Alvaro San Martín, Iñigo Lasa
- P73. Conjugación a microorganismos Gram positivos de interés sanitario e industrial como punto de partida para su modificación genética.**
Pablo Guridi-Fernández, Dolores Lucia Guzmán-Herrador, Andrea Fernández-Gómez, Rafael Falla-Fernández, Silvia Calero, Matxalen Llosa.
- P74. Microscopía de célula viva para estudios funcionales de larga duración en cianobacterias.**
Raquel Gutiérrez-Lanza, Víctor Campa, Alfonso Mendaña, Marina Domínguez-Quintero, Carlos Díaz-Ceballos, María Santos-Merino, Alicia Muro-Pastor, Raúl Fernandez-Lopez
- P76. Identification of pervasive plasmid-chromosome interactions to combat antibiotic resistance.**
Cristina Herencias, Ignacio de Quinto, Laura Jaraba-Soto, Laura Álvaro-Llorente, Álvaro San Millán, Jerónimo Rodríguez-Beltrán
- P77. Evolutionary approaches to tackle *Pseudomonas aeruginosa* infections: transient and stable collateral sensitivity.**
Sara Hernando-Amado, Pablo Laborda, José Luis Martínez
- P78. La “vida oculta” de los genes de resistencia: impacto de *ereA2* en la motilidad bacteriana.**
Alberto Hipólito, Lucía García-Pastor, Ester Vergara, Laura Toribio-Celestino, Álvaro San Millán, José Antonio Escudero.
- P81. Elucidating the components of the *Bacillus subtilis* SP β bacteriophage viral particle.**
Abida Bano, Aisling Brady, Sandra Lahoz-Oliva, Laura Miguel-Romero, Cora Chmielowska, Francisca Gallego del Sol, Alberto Marina, José R Penadés, Nuria Quiles-Puchalt
- P83. (IN)Stability of Synthetic-Replicative plasmids in cyanobacteria.**
Rocío López-Igual, Alicia Segura-Mejías, Daniel Neyra, Rafael Salas-Aparicio, Ignacio Luque
- P84. New genetic tools for the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 680.**
Carmen Pérez-Nieto, Juan E. Pérez-Fernández, Pablo Sousa, Luis G. Heredia, Encarnación Díaz-Santos, Manuel Hervás, José M Ortega, Mercedes Roncel, Jose A Navarro, Luis López-Maury
- P85. *Saccharomyces cerevisiae* como plataforma de estudio de la ruta de inmunidad innata humana cGAS-STING-TBK1.**
Sara López-Montesino, María Molina, Víctor J. Cid

- P88. A novel zinc acquisition system that evolved in ancient bacteria**
Cristina Sarasa-Buisan, Jesús A. G. Ochoa de Alda, Cristina Velázquez-Suárez, Miguel Ángel Rubio, Guadalupe Gómez-Baena, María F. Fillat, Ignacio Luque
- P89. Engineering $\beta\beta$ -solenoid modules: a monomeric LytA autolysin from *Streptococcus pneumoniae*.**
Patricia de Obesso-Cintas; Jesús M. Sanz; Beatriz Maestro
- P90. Antimicrobial resistance analysis of *Listeria* spp. reveals non-pathogenic *Listeria* spp. as a reservoir of transposable elements with tetracycline resistance.**
Yuval Markovich, Carla Palacios-Gorba, Jesús Gomis Almendro, Ángel Gómez-Martín, Susana Ortolá, M.A. Yáñez, Juan J. Quereda
- P93. Study and analysis of class Ia ribonucleotide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*.**
Ángela Martínez-Mateos, Alba Rubio-Canalejas, Eduard Torrents
- P94. Estudio de los genes terminales fermentativos formadores de alcoholes y ácidos grasos de cadena corta presentes en la microbiota intestinal en la esteatosis hepática metabólica.**
Juan Manuel Medina-Méndez, Paula Iruzubieta, Raúl Fernández-López, Javier Crespo, Fernando de la Cruz
- P96. Determinación de las condiciones que evitan la letalidad inducida por oscuridad en cianobacterias defectivas en el ciclo circadiano.**
Alfonso Mendaña, María Santos-Merino, Raquel Gutiérrez-Lanza, Marina Domínguez-Quintero, Danny Ducat, Raúl Fernández-López
- P97. Formación, purificación y análisis estructural de complejos proteína-proteína y proteína-ADN de la maquinaria conjugativa del plásmido R388.**
Tamara Menguiano, Elena Cabezón, Ignacio Arechaga
- P98. Análisis del sistema conjugativo del phylum Cyanobacteria.**
Antonio Mesa-Galán, Fernando De La Cruz, M. Pilar Garcillán-Barcia
- P101. Caracterización de HsbA, un represor de la formación de biofilm en *Pseudomonas Putida*.**
Elisa Montero-Beltrán, Marta Pulido-Sánchez, Aroa López-Sánchez, Fernando Govantes
- P103. Regulación antisentido de la glutamina sintetasa en una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos.**
Isidro Álvarez-Escribano, Belén Suárez-Murillo, Manuel Brenes-Álvarez, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor
- P111. Molecular insights into the many-to-one function of fungal His-phosphotransfer proteins.**
Francisco Paredes-Martínez, Lluís Eixerés, Sara Zamora, Patricia Casino
- P112. The expression of integron arrays is shaped by the translation rate of cassettes.**

André Carvalho, Alberto Hipólito, Filipa Trigo da Roza, Lucía García-Pastor, Ester Vergara, Aranzazu Buendía, Teresa García-Seco, José Antonio Escudero

- P114. Los elementos genéticos móviles definen la estructura no aleatoria del pangenoma del *Salmonella entérica* serovar Typhi.**
Arancha Peñil-Celis, Santiago Redondo-Salvo, Luis Vielva, M Pilar Garcillan-Barcia, Fernando de la Cruz.
- P115. In search of metabolic targets of *Streptococcus suis* that are essential for pig colonization.**
Ayelén Perez Falcón, Maria Juanpere Borrás, Karl Kochanowski, Peter van Baarlen, Jerry Wells, Florencia Correa-Fiz, Virginia Aragón
- P116. Deciphering the role of extracellular matrix components in microbial dialogue between *Bacillus* and pathogenic fungi.**
Alicia I. Pérez-Lorente, Carlos Molina-Santiago, David Vela, Paolo Stincone, Abzer K Pakkir Shah, Antonio de Vicente, Daniel Petras, Diego Romero
- P117. Conditional PC/Cyt mutants in defective soluble electron carriers *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain.**
Carmen Pérez-Nieto, Manuel Hervás, José M Ortega, Mercedes Roncel, Jose A Navarro, Luis López-Maury
- P118. Engineering *E. coli* bacteria for coinjection of ART toxins into PD-L1+ mouse tumor cells.**
Eva Pico Sánchez, Alejandro Asensio-Calavia, and Luis Ángel Fernández
- P119. Role of HWE/HISKA2 Histidine Kinases in the General Stress Response of *Sphingopyxis granuli* TFA.**
Alberto Pires-Acosta, Ángela Rey-Hidalgo, Inmaculada García-Romero, Francisca Reyes-Ramírez
- P121. Heterogeneidad fenotípica en el superintegrón de *Vibrio cholerae*.**
Amalia Prieto Nieto, Alberto Hipólito, Filipa Trigo Da Roza, Ester Vergara, Lucía García-Pastor, José Antonio Escudero
- P123. Bases moleculares de la amplificación adaptativa del gen de la carbapenemasa NDM-1.**
Mario Pulido-Vadillo, Jose F Delgado-Blas, Carlos Serna, Javier F Favieres, Bosco R Matamoros, Natalia Montero, Bruno Gonzalez-Zorn
- P127. Copy number analysis reveals a universal scaling law governing plasmid biology.**
Paula Ramiro-Martínez, Ignacio de Quinto Cáceres, João Alves Gama, Jerónimo Rodríguez-Beltrán
- P128. Comparación de efectores de la familia NEL de ligasas de ubiquitina de *Salmonella*.**
Andrea Bullones Bolaños, Paula Martín Muñoz, Claudia Vallejo Grijalba, Joaquín Bernal Bayard, Francisco Ramos Morales

- P130. Functional Metagenomic for discovery of novel enzymes of industrial and environmental interest.**
Valentín Ángel Limón Sarabia, Irene Párraga Borrell, Eva María Camacho Fernández, Francisca Reyes-Ramírez.
- P134. Control of mutation rate by a *nucS* antisense RNA in *Mycobacterium tuberculosis*.**
Ruiz-Enamorado. A, Moreno. R, Blazquez. J
- P136. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus spp.***
Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Marina Costa, M^a del Pilar Marin, Irene Cruz, Amparo Valentín, Juan Frasset, M^a Ángeles Tormo-Mas
- P140. La metilación del DNA en bacterias tiene un papel en el control de la susceptibilidad a antibióticos.**
Rocío Fernández-Fernández, Francine Amaral-Piubeli, Hervé Nicoloff, Dan I. Andersson, María Antonia Sánchez-Romero
- P141. Sabotaging *Mycobacterium tuberculosis* virulence with a Transcription Factor Genetic Trap.**
Laura Sanz-Asensio, Estefanía Crespo-Yuste, Juan Calvet-Seral, Jesús Gonzalo-Asensio
- P143. Prior steps in the reduction of cyanobacterial genomes: Toxin-Antitoxin systems as stabilization modules.**
Alicia Segura-Mejías, Rocío López-Igual
- P145. Descubriendo el amiloma intestinal: identificación y detección de amiloides en la microbiota intestinal.**
Miriam Serrano, Alejandro Toledo-Arana, Jaione Valle
- P149. Development of an innovative intravaginal model of probiotic inoculation in dairy ovine farms: evidence of positive effects on the vaginal microbiota, vaginitis and fertility.**
Marion Toquet, Jesús Gomis, Estrella Jiménez-Trigos, Esther Bataller, Marta Barba, Antonio Sánchez, Pedro González-Torres, Ángel Gómez-Martín
- P151. Nuevos sistemas de detección de SARS-CoV-2 basados en nanomateriales con puertas moleculares.**
M^a Ángeles Tormo Mas, Isabel Caballos, Alba López-Palacios, Yoel Esteve-Sánchez, Andy Hernández-Montoto, Eva Calabuig, M. Dolores Gómez-Ruiz, Elena Aznar, Ramón Martínez-Máñez
- P152. Interplay of *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* in coinfection: Biofilm Dynamics and Host Immune Response.**
Víctor Campo-Pérez, Esther Julián, Eduard Torrents
- P153. *Streptococcus suis* transfirió genes de resistencia a antibióticos a otros estreptococos patógenos de humanos.**
Cristina Uruén, María José Lavilla, Antonio Rezusta, Clara Marín, Jesús Arenas

- P156. rRNA synthesis during growth in *Mycobacterium tuberculosis* on different carbon sources.**
Lucía Vázquez Iniesta, Sogol Alebouyeh, Rafael Prados-Rosales, M. Carmen Menéndez, María J. García
- P157. rRNA processing in cyanobacteria.**
Cristina Velázquez-Suárez, Manuel Brenes-Álvarez, Fernando Delgado-Cháves and Ignacio Luque
- P158. *Pseudomonas aeruginosa* non-essential hub proteins are implicated in virulence.**
Daniel Yero, Oscar Conchillo-Solé, Joan Lluís Pons, Marc Bravo, Isidre Gibert·Xavier Daura
- P160. Regulación de promotores flagelares de Clase II activados por FleQ en *Pseudomonas putida*.**
María Zapata-Cruz, Aroa López-Sánchez, Fernando Govantes
- P161. A biotechnological tool to detect integron cassettes.**
Filipa Trigo da Roza, André Carvalho, Paula Blanco, Ester Vergara, Modesto Redrejo, Melanie Blokesch, José Antonio Escudero
- P162. Plasmid-encoded insertion sequences promote rapid adaptation in clinical enterobacteria.**
Jorge Sastre-Dominguez, Javier DelaFuente, Laura Toribio-Celestino, Cristina Herencias, Pedro Herrador-Gómez, Coloma Costas, Marta Hernández-García, Rafael Cantón, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Alfonso Santos-Lopez, Alvaro San Millan
- P163. A High-Throughput Microtiter Plate Screening Assay to Quantify and Differentiate Species in Dual-Species Biofilms.**
Víctor Campo-Pérez, Júlia Alcàcer-Almansa, Esther Julián, Eduard Torrents
- P164. Efectos de la microbiota intestinal del mosquito tigre (*Aedes aegypti*) en la resistencia a la colonización por bacterias de interés para el control de enfermedades transmitidas por vectores.**
Pol Nadal-Jimenez, Eva Heinz, Grant L. Hughes
- P165. Characterization of K2-ST66 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains (hvKp), a rare sublineage among the hvKp pathotype.**
Domingo Fernández Vecilla, Jorge Rodríguez Grande, Nuria Fraile Valcárcel, Daniela Vallejo Iriarte, Pedro Bustamente de la Escalera, Jorge Calvo Montes, Alain Ocampo Sosa
- P166. Genomics of the wheat seed microbiome.**
Irene Sanz-Puente, Santiago Redondo-Salvo, Arancha Peñil-Celis, Jorge Rodríguez Grande, Alain Ocampo Sosa, Fernando de la Cruz, Marta Robledo

- P167. Atacando la diseminación de resistencias antimicrobianas: bacteriófagos específicos contra plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador.**
Yelina Ortiz, Maite Muniesa, Fernando de la Cruz, Raúl Fernández-López
- P168. El moviloma confinado de la familia *Erwiniaceae*.**
Santiago Redondo-Salvo, Irene Sanz-Puente, Marta Robledo, M. Pilar Garcillán-Barcia, Fernando de la Cruz
- P169. Análisis de la implicación del sistema de señalización mediado por c-di-GMP en la resistencia de *Salmonella* a la bilis.**
Laura Imedio, Leire Azparren, Carmen Gil-Puig y Cristina Solano

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES



***Streptococcus salivarius* synthesizes and secretes essential amino acids: potential effects on the oral-brain axis**

Adrados-Planell, A.^{1*}, Pascual, J.², Revilla-Guarinos, A., Carda-Diéguez M.¹, Vilanova, C.², Gimeno, H.², Porcar, M.², Mira, A.¹

¹Genomics and Health Department, FISABIO foundation, Valencia, Spain; ²Darwin Bioprospecting Excellence SL., Paterna, Spain.

ana.adrados@fisabio.es

Humans need 9 essential amino acids (EAAs) for optimal growth and function [1]. Unlike some mammals, which can absorb EAAs produced by intestinal microorganisms, diet is the main strategy for EAAs incorporation in humans. This is particularly relevant given the prevalence of processed and nutritionally poor food consumption in developed countries, as many EAAs are precursors of neurotransmitters linked to neurological disorders. These pathologies are also associated with microbial dysbiosis [2], especially in the context of ageing, excessive antibiotic use and changes in parenting behaviour. The oral cavity serves as a major gateway for pathogens and environmental factors, and changes in its microbial composition have a systemic impact in human health [3] and yet, the oral microbiome contribution to dietary requirements has not been addressed. *Streptococcus salivarius* is a commensal bacterium of the human oral niche with favourable characteristics as a probiotic [4]. We aimed to assess the capacity of three oral isolates identified as *S. salivarius* spp. for amino acid (AA) biosynthesis and its contribution to EAAs balance. For comparison, the oral probiotic *S. salivarius* BLIS 18™ was included in the analysis. We identified the key genes for EAAs biosynthesis in the genomes of *S. salivarius* and confirmed route activation in minimum medium lacking AAs by RT-qPCR. AAs biosynthesis and accumulation over time in bacteria supernatants were analysed by UPLC-QToF-MS. Colony-forming units (CFUs) necessary to meet adult daily EAA recommended intake (DRI) were calculated. Results varied by strain and EAA, but in range for probiotic usage (10^7 - 10^{11} CFUs). Genome analysis of bacteriocin profiles and antimicrobial activity against the caries-associated oral pathogen *Streptococcus mutans* were also conducted. Cell-free supernatants of the three *S. salivarius* isolated rendered comparable growth inhibition to BLIS 18™. Additionally, in terms of acidification and fluoride resistance, the three candidates exhibited superior features compared to the probiotic reference. This study represents an initial step in understanding how EAAs from the oral microbiota can influence human physiology and shows how health-associated oral bacterial can provide a probiotic strategy not only to promote oral health but also a potential to influence systemic diseases related to the oral-brain axis.

References.

[1] Reeds, P. J. *J Nutr* (2000) 130, 1835S-1840S; [2] Hashimoto K. *Mol Psychiatry* (2023) PMID: 37845499; [3] Peng, X., Cheng, L., You, Y. *et al.* *Int J Oral Sci* (2022) 14, 14.; [4] Tagg JR, Harold LK, Jain R, *et al.* *Front Microbiol.* (2023) 14:1161155.

Acknowledgements/Funding:

This work was supported by grant from Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública Plan GenT Generació Talent 2019 Anex II (CDPT-02/20-B), in collaboration with Darwin Bioprospecting Excellence SL.



Análisis del efecto de los amiloides de la microbiota sobre la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica

Ainara Aginaga¹, Miriam Serrano¹, Alejandro Toledo-Arana¹, Macarena Sanchez², Jaione Valle¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología (IdAB). CSIC- Gobierno de Navarra, Mutilva, España.

² Instituto de Parasitología y Biomedicina "López - Neyra", Granada, España.

ainara.aginaga@csic.es

El eje intestino-cerebro proporciona una vía bidireccional de comunicación entre el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central. En ciertas situaciones, como las que implican la edad y/o una microbiota alterada, la función de la barrera intestinal y hematoencefálica puede verse alterada permitiendo la translocación de subproductos derivados de la microbiota. Estos subproductos pueden ejercer sus efectos en el sistema nervioso central, a través del sistema nervioso entérico, y/o tener un efecto directo al propagarse al cerebro. El descubrimiento de amiloides bacterianos en la microbiota intestinal, incluida la proteína Esp de ciertas cepas de *Enterococcus*, ha despertado interés por su posible conexión con enfermedades neurodegenerativas. Nuestro grupo ha demostrado que los amiloides Esp de *E. faecalis* inducen la agregación de la proteína amiloide humana α -sinucleína, asociada al Parkinson. Además, la abundancia de *esp* en el microbioma intestinal está correlacionada con la incidencia de la enfermedad de Parkinson.

En este estudio nos planteamos analizar si los amiloides Esp de la microbiota intestinal tienen un efecto en la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica. Empleando modelos celulares de barrera intestinal basados en células Caco-2 cultivadas en placas Transwell, así como de barrera hematoencefálica con células endoteliales cerebrales, hemos determinado que los amiloides bacterianos inducen cambios en la integridad de las barreras celulares. Las imágenes de inmunofluorescencia de las proteínas zonulina-1 y claudina revelaron roturas de las uniones intercelulares de células tratadas *in vitro*. Asimismo, los niveles de expresión de estas proteínas disminuyeron en aquellas células tratadas con Esp. Por último, el incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal fue confirmado *in vivo* utilizando ratones tratados con amiloides Esp.

Estos hallazgos indican que los amiloides Esp pueden afectar a la integridad de las barreras intestinal y hematoencefálica, facilitando su propagación y la de sustancias nocivas hacia el cerebro, contribuyendo a la neurodegeneración. Estos resultados enfatizan la importancia de entender la conexión entre la microbiota intestinal y la salud neurológica, y sugieren que los amiloides bacterianos podrían ser un objetivo terapéutico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.



Exploring host-pathogen interactions: Unraveling the dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* infection in *Galleria mellonella*

Júlia Alcàcer-Almansa^{1,2}, Joana Admella^{1,2}, Núria Blanco-Cabra^{1,2}, Eduard Torrents^{1,2,*}

¹Bacterial infections and antimicrobial therapies group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain.

²Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

jalcacer@ibecbarcelona.eu

Pseudomonas aeruginosa and *Burkholderia cenocepacia* are two multidrug-resistant opportunistic pathogens often isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. It is known that the presence of more than one species in an infection promotes the appearance of a network of interactions that can lead to an increase in their antimicrobial tolerance or to the evasion of the host immune system. *Galleria mellonella* has been used as an animal model throughout this study, as its primary immune response is comparable to that of mammals, and it presents practical advantages such as easy maintenance. In order to comprehend bacterial and host behaviors post-infection with single and dual bacterial cultures, the survival rate of *Galleria mellonella* after a *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* was monitored. Additionally, the efficacy of antibiotic treatment against these infections was assessed. Also, to characterize the infection evolution, tissue-specific infection dissemination and hemocyte phagocytosis were evaluated through confocal microscopy. Finally, the infection evolution was analyzed from a molecular point of view, comparing immunity-related *Galleria mellonella* gene expression as well as bacterial virulence-related gene expression in single and dual-species infected groups. The comparison provided insights into how the presence of multiple bacterial species affects the host immune response and bacterial virulence. This comprehensive study sheds light on the intricate interplays between host and pathogens and the underlying mechanisms of polymicrobial infection, taking us a step further in the development of more effective therapeutic strategies against polymicrobial infections.

This study was partially supported by grants PID2021-125801OB-100, PLEC2022-009356 and PDC2022-133577-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2021SGR01545), the European Regional Development Fund (FEDER) and Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social “La Caixa”. J.A-A. is thankful to MCIN for its financial support through a PRE2021-098703 grant funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and co-funded by the ESF+. N.B-C. acknowledges the Margarita Salas grant from the Ministerio de Universidades, Spain, funded by the European Union-Next Generation EU.



Study of effects of cannabinoids on HIV-1 infection. Analysis of their potential anti-latency action and mechanism of action

Marcos Alonso Arribas, Luis Miguel Bedoya Del Olmo

Inmunopatología del SIDA, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII

marcosalonsoarribas@gmail.com

Antiretroviral treatment for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is not capable of eliminating reservoirs in which infection remains latent. New strategies, such as shock and kill, have been tried. Shock and kill strategy raises the possibility of using latency-reversing agents (LRAs) as a “shock” for reactivating HIV-1, allowing “kill” for the immune system or antiretroviral drugs.

Cannabinoid pathways induce repression or activation in gene expression depending on the type of ligand and receptor. Cannabinoid type 2 receptor (CB2) is mainly expressed by immune system cells, including T CD4+ cells. In general, it is believed that cannabinoids induce a repression of T cells activation. Therefore, we hypothesize here that CB2 antagonists could reactivate viral expression in HIV-1 latently infected cells. This work assesses the toxicity and viral latency effects of several CB2 ligands, such as Cannabidiol (CBD), Anandamide, SR144528 or Noladin ether, and investigate their potential effects as LRAs.

Our first results showed cellular toxicity with CC50s of 25-50 μ M for cannabidiol. A viral reactivation increase has been detected but close to the toxic concentrations. However, cannabidiol effects are complex, including an antagonist activity in CB2 receptor, but also a partial agonist activity on CB1 receptors. Thus, more research is needed with other CB2 antagonists on the CB2 cellular path and the possible interference with HIV-1 infection.



Plasmid-mediated beta-lactam resistance induces collateral sensitivity in *Escherichia coli*

Laura Álvaro-Llorente, Cristina Herencias, Laura Jaraba-Soto, Paula Ramiro-Martínez, Ada Muñoz-Cazalla, Álvaro San Millán, Jerónimo Rodríguez-Beltrán

Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

lalfru13@gmail.com

Major antibiotic groups are losing effectiveness due to the uncontrolled spread of genes for antimicrobial resistance (AMR). In Enterobacterales, the most common resistance mechanism are β -lactam resistance genes –encoding β -lactamases– due to their frequent association with mobile genetic elements. In this context, novel approaches that counter mobile AMR are urgently needed. One approach to eliminating AMR is to exploit collateral sensitivity (CS), which occurs when the acquisition of resistance to one antibiotic increases susceptibility to another. However, most CS networks described so far emerge as a consequence of chromosomal mutations and cannot be leveraged to tackle mobile AMR. Here, we dissected the CS response elicited by the acquisition of a prevalent antibiotic resistance plasmid, revealing that the expression of the β -lactamase blaOXA-48 induces CS to colistin and azithromycin. We next showed that other clinically relevant mobile β -lactamases produce similar CS responses in multiple, phylogenetically unrelated *E. coli* strains. Transcriptomic analyses and enzymatic assays suggest that periplasm homeostasis underlies β -lactamase induced CS. These results highlight that the physiological side-effects of β -lactamases can be leveraged therapeutically, paving the way for the rational design of specific therapies to block mobile AMR or at least counteract their effects.

References:

Herencias, C., Álvaro-Llorente, L., Ramiro-Martínez, P., Muñoz-Cazalla, A., DeLaFuente, J., Jaraba-Soto, L., Castillo-Polo, J. A., Cantón, R., Millán, Á. S., & Rodríguez-Beltrán, J. (2023). β -lactamase expression induces collateral sensitivity in *Escherichia coli*. *BioRxiv*, 2023.11.22.568265. <https://doi.org/10.1101/2023.11.22.568265>

Herencias, C., Rodríguez-Beltrán, J., León-Sampedro, R., Del Valle, A. A., Palkovičová, J., Cantón, R., & Millán, Á. S. (2021). Collateral sensitivity associated with antibiotic resistance plasmids. *ELife*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.65130>



Identificación de antígenos de *Candida albicans* reconocidos por IgAs procedentes de intestino de ratón mediante técnicas inmunoproteómicas

Álvaro, Marina; Blesa, Alba; Prieto, Daniel; Cortés, Isabel; Sanz, Alejandro; García, Lucía; Román, Elvira; Pla, Jesús; Alonso-Monge, Rebeca

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS)

malvar20@ucm.es; realonso@ucm.es

La inmunidad generada en las mucosas del tracto intestinal desempeña un papel crucial en la defensa contra patógenos como *Candida albicans*, un hongo dimórfico comensal que puede producir diversas patologías en personas con una inmunidad deficiente. La respuesta inmunitaria de tipo IgA se genera principalmente frente a las formas hifales del hongo. En este estudio, hemos realizado la identificación de antígenos específicos de *C. albicans* que son reconocidos por IgAs en el intestino de ratón generadas tras la colonización del tracto digestivo por *C. albicans* en un modelo de ratón cuya microbiota intestinal había sido reducida por la administración de antibióticos.

Para ello, hemos utilizado una aproximación inmunoproteómica independiente de gel y se han analizado dos tipos de muestras: péptidos de superficie y productos de secreción de hifas de la cepa SC5314. Esta aproximación metodológica nos ha permitido identificar 315 proteínas en total, de las cuales, 105 son comunes en las distintas muestras. El análisis por Gene Ontology de los resultados indica que las muestras están enriquecidas en proteínas localizadas preferentemente en la superficie celular, son proteínas de secreción o forman parte de los *biofilms* microbianos. Los análisis de funcionalidad muestran que estas proteínas cumplen funciones diversas no distinguiéndose una función mayoritaria: son proteínas estructurales, de transporte, metabólicas, interacción con otros organismos, etc.

Adhesinas como Als3, Als1 y Hwp1 fueron identificadas en estos ensayos. Para validar los resultados, hemos sobreexpresado los genes que codifican estas proteínas en un mutante de *C. albicans* incapaz de filamentar. El mutante no es reconocido por las IgAs procedentes de ratones colonizados por *C. albicans* mientras que las cepas sobreproductoras sí lo son; este reconocimiento depende de la expresión de la adhesina analizada. Nuestros resultados indican que la respuesta humoral de tipo IgA en el tracto intestinal está dirigida contra proteínas que tienen funciones diversas, siendo principalmente proteínas de superficie presentes en las formas filamentosas y, algunas de ellas, factores de virulencia establecidos como Als3. Conocer los antígenos de *C. albicans* frente a los cuales responde el sistema inmunitario puede constituir la base para el desarrollo de herramientas inmunológicas para el control de candidiasis sistémicas.

Financiación:

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto IMMUNOFUN PID2021-122648NB-100 otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.



Exploring bacterial activities from different environments by functional metagenomics

Luis Andreo-Andreu¹, Cynthia Alías-Villegas¹, Sebastián Acosta-Jurado¹, Alejandro

Díaz-Moscoso², Amando Flores¹, Eva María Camacho¹

¹ Universidad Pablo de Olavide - Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

² Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja), CSIC-US.

landand@alu.upo.es

The immense bacterial genetic diversity offers us a great variety of functions that can be useful at the industrial level and can contribute to solve global problems. However, it is estimated that more than 99% of bacteria cannot be cultivated under laboratory conditions, so all this information cannot be explored using traditional techniques.

To carry out this strategy, our group has developed a series of vectors and strains that allow heterologous expression of environmental DNA in a salicylate-inducible manner, insensitive to transcription terminators and allowing control of fosmids copy number by arabinose¹. In addition, we have developed a controlled autolysis system that can be used in combination with our metagenomics libraries. This system responds to anhydrotetracycline by lysing the bacteria to facilitate the detection of activities that are not released outside the cell².

In our laboratory we have constructed several metagenomics libraries from different environments, including two from soils contaminated with petroleum derivatives, one from *Streptomyces* strains provided by the MEDINA foundation and another from a pristine site, Los Alcornocales Natural Park. These metagenomic libraries have been used to screen for different activities of environmental, industrial or health interest and genes with previously undescribed activities have been discovered. Here we present recent advances we have obtained with some of these metagenomic clones.

Acknowledgements:

This work has been supported by the Grant TED2021-132239B-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by NextGenerationEU/PRTR

References:

1. Terrón-González L, Medina C, Limón-Mortés MC, Santero E. Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci Rep.* 2013;3(1):1107. doi:10.1038/srep01107
2. Cárcel-Márquez J, Flores A, Martín-Cabello G, Santero E, Camacho EM. Development of an inducible lytic system for functional metagenomic screening. *Sci Rep.* 2019;9(1):3887. doi:10.1038/s41598-019-40470-4



Evaluación de métodos de screening genómico para la identificación de productores de biosurfactantes y sideróforos en bacterias halófilas moderadas

Antón T¹, Arranz A¹, Franco M², Nieto JJ¹, Vargas C¹, Salvador M^{1,2}, Argandoña M¹

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

² Biotechnology division, IDENER.AI, Sevilla

tanantrod@alum.us.es

Actualmente, los compuestos anfílicos no-fósiles, tales como biosurfactantes y algunos tipos de sideróforos, que por su naturaleza dual (hidrófila e hidrófoba), presentan capacidad de formar micelas, son de gran interés biotecnológico ya que encuentran múltiples aplicaciones en áreas como farmacia, cosmética, medicina o agricultura. Nuestro objetivo es encontrar y/o diseñar nuevos sideróforos y biosurfactantes de interés industrial a partir de nuevas fuentes, como son los microorganismos extremófilos, en concreto, bacterias halófilas moderadas. Para ello se hace necesario en primer lugar, optimizar métodos de screening tanto *in vivo* como *in silico*, basados en el genoma, para la identificación de nuevas moléculas, sus correspondientes clústeres biosintéticos, así como los productores naturales, para, posteriormente, identificar o diseñar “a la carta” mediante combinación génica dirigida basada en *machine learning*, aquellos que tengan las propiedades específicas deseadas.

En primer lugar, se localizaron más de 900 especies de bacterias halófilas moderadas descritas, mediante búsqueda bibliográfica y consulta en diferentes bases de datos, y se seleccionaron aquellas que tenían el genoma depositado en NCBI. Posteriormente se realizó un screening genómico de 471 genomas para localizar grupos de genes biosintéticos (BGC, “biosynthetic gene cluster”) con la herramienta antiSMASH 7.0¹ localizándose más de 140 y 160 BGCs encargados de la síntesis de biosurfactantes o sideróforos, respectivamente, en más de 50 y 70 géneros. En base a estos resultados, se recopiló una colección de 40 cepas potencialmente productoras de alguno de los dos tipos de compuestos, abarcando la mayor diversidad taxonómica, genómica, geográfica y ambiental posible, con el objetivo de lograr una gran variedad estructural de biomoléculas. Tras el análisis *in vivo* empleando diferentes métodos de detección previamente optimizados, se observó la actividad predicha en la mayoría de cepas. Sin embargo, la identificación de un grupo de cepas que fueron productoras *in vivo*, pero negativas en antiSMASH derivó en un segundo screening *in silico* empleando una nueva aproximación que combina herramientas basadas en homología y *deep-learning*, que permitió localizar nuevos BGCs en algunas de estas cepas. Nuestros resultados muestran la complementariedad de los dos métodos de screening genómico, así como el enorme potencial sintético de las bacterias halófilas moderadas.

Financiación: This project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 101000794

Referencia:

- 1 Kai Blin et al (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization. *Nucleic Acids Research*, 51(W1):W46-W50. DOI 10.1093/nar/gkad344.



Genetically engineering *Pseudomonas* strains for T6SS-dependent controlled release of effectors

Araujo-Garrido, Mario; Pérez-Lorente, Alicia Isabel; Romero, Diego; Molina-Santiago, Carlos
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), Málaga, 29071, España.

mario17ag@uma.es

The increasing demand for resources is one of the most challenging issues that human society is facing. Fortifying primary services in a sustainable manner, particularly agriculture, is the main solution to solve this challenge. However, excessive use of chemical agents and pesticides is causing the appearance of uncontrolled phytopathogens (encompassing fungi, bacteria, and viruses), affecting negatively to crops' viability, and decreasing economical gains. According to the Green New Deal of the European Union, agriculture must evolve in a sustainable way, preventing the use of polluting pesticides and replacing them by more respectful strategies, such as the use of microorganisms of biocontrol to reduce damages caused by phytopathogens.

Microorganisms are continuously interacting between them and with the environment. For that, they use a vast arsenal of molecules and microbial systems. Among them, the Type VI Secretion System (T6SS) is a syringe-like nanomachine commonly found in Gram-negative bacteria that injects effectors into prokaryotic and eukaryotic target cells leading to bacterial cell death and, therefore, modulating interspecies and interkingdom interactions given in an ecological niche.

In this work, with the development of different proofs of concept, we highlight the potential of T6SSs to be used as a potential biotechnological application in biocontrol against phytopathogens. To do that, genetic engineering of *P. putida* KT2440 have been combined with controlled expression of related and non-related T6SS effectors to provide this strain with different molecules for the inhibition of bacteria and fungi. Specifically, we show the heterologous expression of T6SS effectors from *Pseudomonas chlororaphis* and *Serratia marcescens* to inhibit Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. In addition, we demonstrate the double role of Tfe2 from *S. marcescens* as an antibacterial and antifungal effector. Finally, we show the controlled release of non-related T6SS proteins by the T6SS of *P. putida* KT2440, such as a chitinase belonging to *Bacillus subtilis*, degrading the chitin of the pathogenic fungi *Botrytis cinerea*.

These findings demonstrate the potential to manipulate the T6SS for targeted delivery of exogenous effectors against specific pathogens, paving the way for the creation of innovative biotechnological solutions in combating phytopathogens and promoting sustainable agriculture practices.

This work is funded by Consolidación Investigadora 2022 (CNS2022-135744) from Ministerio de Ciencia e Innovación.



The non-conjugative plasmids: unveiling the mobility of the supposedly untransmissible.

Manuel Ares Arroyo, Eduardo P. C. Rocha

Evolutionary Genomics Unit, Institut Pasteur. Paris, France

manuel.ares-arroyo@pasteur.fr

Plasmids are major drivers of bacterial evolution. However, despite decades of research, we have little clue on the mobility mechanisms of most plasmids since they lack the genes required for conjugation (“pMOBless” hereinafter). How these plasmids move has remained a longstanding enigma in the field until pioneering works suggested that many pMOBless in *Staphylococcus aureus* could carry conjugative origins of transfer (*oriT*), thus, could potentially be mobilized¹. Following this work, we analysed the presence of experimentally validated *oriT*s in >2,000 complete genomes of *S. aureus* and *E. coli*, the two leading nosocomial species in terms of antimicrobial resistance associated deaths. Importantly, *oriT*s were present in most pMOBless, suggesting that most plasmids can transfer via self-conjugation or trans-mobilization. Intriguingly, most plasmids require other elements in order to conjugate, suggesting complex networks of functional dependencies between plasmids in these species. To ascertain the universality of our previous findings, we expanded our analysis to all the species represented in RefSeq. Conversely, our results revealed that the little knowledge regarding *oriT*s outside few well-studied species impeded our analysis, since we ignore the vast majority of *oriT*s even in the canonical conjugative and mobilizable plasmids. To solve this scarce of knowledge, we proceeded with an integrative analysis of the known origins of transfer to devise an innovative approach for the *de novo* identification of *oriT*s. Our in-depth analysis led us to the characterization of numerous novel putative *oriT*s, many of these representing the first *oriT* characterizations in their respective species. This approach can be applied to any bacterial species, where is already giving rise to new perspectives on plasmid mobility. Overall, our work is casting under a novel light the role of mobile genetic elements in horizontal gene transfer in bacteria.

1. O'Brien FG, et al. Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 2015 Sep 18;43(16):7971-83. doi: 10.1093/nar/gkv755.



Homeostasis del Fe y osmoadaptación: estudio de la red de regulación dependiente de los metaloreguladores Fur en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*

Argandoña M, Naranjo E, Torres L, Salvador M, Martínez-Martínez L, Nieto JJ, Vargas C.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

montseab@us.es

Chromohalobacter salexigens es una bacteria halófila moderada que sintetiza ectoínas en respuesta al estrés osmótico, lo que deriva en una adaptación del metabolismo en función de la salinidad^{1,2}, y en la que existe una estrecha relación entre la homeostasis de Fe y la osmoadaptación^{2,3}. Estos procesos se regulan de manera coordinada y precisa, gracias a una compleja red de regulación de reguladores globales y específicos, y sistemas de señalización, siendo necesario un estudio más detallado e integrado a nivel global y molecular que permita dilucidar dicha red y el papel de cada elemento regulador. Este conocimiento contribuirá al desarrollo de un modelo de regulación a escala genómica que permitirá diseñar cepas mejoradas en la producción de ectoínas, compuestos de gran interés biotecnológico⁴.

Entre estos reguladores globales se encuentran dos metaloreguladores de la superfamilia FUR, Fur1 y Fur2, que, en función de las condiciones de salinidad, se encargan de mantener un control preciso de los niveles de hierro intracelulares, así como de ectoínas³. En este trabajo se han llevado a cabo estudios de RNAseq y ChIPseq de mutantes en ambos metaloreguladores, en condiciones de alta (0,6 M NaCl) y baja salinidad (2,5 M NaCl), condiciones de alta y baja producción de ectoínas respectivamente, con el objeto de dilucidar parte de dicha red de regulación y profundizar en el papel de ambos reguladores.

Los resultados muestran el gran impacto de los reguladores Fur en *C. salexigens*, observándose un elevado número de genes afectados, destacando el papel relevante de ambos en el metabolismo además de en la síntesis de solutos compatibles y la homeostasis del Fe. También han puesto de relevancia el papel diferente de ambos reguladores, pudiendo actuar como activadores o inhibidores en función de las condiciones ambientales, tanto de forma conjunta o independiente. Finalmente, el análisis individual e integrado de los datos de ChIPseq y RNAseq ha contribuido a dilucidar el regulón directo e indirecto de cada metaloregulador en función de la salinidad, en el que se incluyen numerosos reguladores, lo que contribuirá a refinar la compleja red transcripcional que controla la adaptación de *C. salexigens* y la síntesis de ectoínas.

Financiación: Proyecto (PID2019-111273RB) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación I00/AEI/10.13039/501100011033;

Referencias:

¹ Pastor et al., 2010. The Journal of Biological Chemistry. 288:17769-81.

² Salvador et al., 2018. Frontiers in Microbiology. 13:9:1845.

³ Argandoña et al., 2010. Applied and Environmental Microbiology. 76:3575-89

⁴ Pastor et al., 2010. Biotechnology Advances. 28:782-801



Bacterial responses to complex mixtures of environmental resources exhibit simple patterns

Andrea Arrabal, Magdalena San Román, Juan Díaz-Colunga, Álvaro Sánchez.

Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG-CSIC)

andrea_arrabal@usal.es

Microorganisms play a pivotal role in biotechnology, prompting the need for strategies to optimize their functions. While most efforts have focused on the manipulation of bacterial genomes to improve traits of interest, less attention has been paid to the environment where microorganisms grow. Microorganisms inhabit nutritionally complex, containing numerous resources that collectively affect their fitness and phenotypes. Can we optimize microbial functions through rational environmental manipulations?

In this work, we designed a simple, rapid and reproducible methodology to generate all possible combinations of eight environmental resources, including carbon sources, vitamins, and mineral supplements. We then quantified the fitness of five *Pseudomonas* strains in each of 256 the environments. We found that the addition of a resource often exhibits sign variation: a same resource may act as growth promoter or growth inhibitor depending on the presence or absence of additional resources in the environment.

This phenomenon results from a complex network of interactions between resources. The existence of these interactions can be thought of as a complication for predicting how a given environment will affect a target phenotype of an organism. However, we found that simple statistical models are often able to capture the aggregate effect of resource interactions. These models allow us to predict microbial function in untested resource mixtures, unlocking our ability to rationally design microbial habitats for biotechnological purposes.



Tryptophan availability and derived metabolites modulate the host-pathogen crosstalk during *Haemophilus influenzae* infection and reveal aryl hydrocarbon receptor as a key contributor

Javier Asensio-López^{1,2,3}, Beatriz Rapún-Araiz^{1,3}, Begoña Euba^{1,3}, David San León⁴, Goizeder Almagro¹, Celia Gil-Campillo^{1,3}, Saioa Burgui², Juan Nogales^{4,5}, Alejandro Toledo-Arana¹, Junkal Garmendia^{1,3#}

¹Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC)-Gobierno de Navarra, Mutilva, Spain; ²Asociación de la Industria Navarra (AIN)-Gobierno de Navarra, Cordovilla, Spain; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain; ⁴Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Madrid, Spain; ⁵Interdisciplinary Platform for Sustainable Plastics towards a Circular Economy-Spanish National Research Council (SusPlast-CSIC), Madrid, Spain

javier12695@gmail.com

Tryptophan is an essential amino acid that needs to be supplied in the diet. Tryptophan is endogenously metabolized by host cells and gut commensal bacteria, resulting in host signalling molecules. Tryptophan metabolites are ligand activators of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a central player in the homeostasis maintenance of lung health, whose expression protects against COPD development. Moreover, COPD patients have a progressive reduction in indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity, which catalyzes the conversion of tryptophan to *N*-formylkynurenine. Given that IDO1 activity provides AhR activating ligands, such reduction supports the reduced AhR signalling observed in COPD.

Haemophilus influenzae (Hi) is a human-adapted bacterial pathobiont causing airway infections in COPD patients. Previous work using transposon mutant library sequencing revealed bacterial tryptophan metabolic requirements during infection. Also, profiling of murine lung gene expression upon Hi infection showed downregulation of AhR and downstream effectors, together leading to hypothesize that both bacterial and host lung tryptophan availability and metabolism may be key contributors to this host-pathogen interplay.

Given that Hi synthesizes tryptophan *de novo*, extracellular tryptophan is not needed for Hi growth, but modulates amino acid consumption, acetate and indole excretion, and overall bacterial transcriptome. Indeed, transcriptome analysis of the *sdaCA/mtr* region, where *mtr* encodes a tryptophan transporter, *sdaC* a L-serine transporter, and *sdaA* a L-serine desaminase, showed a long 3'UTR overlap transcriptomic event, validated by oligo specific RT-PCR, whose effects on gene expression were elucidated by using a panel of *ad hoc* generated plasmids.

Likewise, tryptophan auxotrophy impairs Hi *in vitro* growth and *in vivo* fitness during murine airway infection, leading us to consider tryptophan biosynthesis as a potential source of drug targets. Indeed, the microbiota-derived tryptophan analogue indole propionic acid (IPA) inhibited Hi growth in a dose-dependent reversible manner. Furthermore, changes in the host tryptophan availability introduced through the diet, sharply modulated murine lung immune responses to Hi infection, by enhancing expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α pro-inflammatory cytokines, IL-22 and SOCS-2 AhR downstream effectors, and IDO-1.

Our results shed light on bacteria and host elements dictating the complexity and fitness of Hi within the lung, and provide novel insights for antimicrobial development.

References:

Euba B, Gil-Campillo C, Asensio-López J, López-López N, Sen-Kilic E, Díez Martínez R, Burgui S, Barbier M, Garmendia J., 2023. *In Vivo* Genome-Wide Gene Expression Profiling Reveals That *Haemophilus influenzae* Purine Synthesis Pathway Benefits Its Infectivity within the Airways. *Microbiol Spectr* 11:e00823-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00823-23>

Funding: This work has been funded by grants MICIU PID2021-125947OB-I00 to J.G. CIBER is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.



Deciphering the MlrA/CsgD/c-di-GMP network in *Salmonella* biology

Leire Azparren, Laura Imedio, Maite Echeverez y Cristina Solano

Laboratory of Microbial Pathogenesis, Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra (UPNA)-Hospital Universitario de Navarra (HUN), IdiSNA, Irunlarrea 3, Pamplona, 31008 Navarra, Spain

leire.azparren@unavarra.es

Salmonella is an animal and zoonotic pathogen of global importance that follows a cyclic lifestyle in which host colonization is alternated with periods of survival outside the host. This transition depends enormously on the capacity to form biofilms. In *S. enterica*, the transcription factor CsgD is considered the master regulator of biofilm formation because it activates the production of the main components of the biofilm extracellular matrix. On one hand, it triggers expression of *csgBAC*, involved in curli fimbriae production, and on the other, it promotes cellulose production by transcriptionally activating *dgcC*, a gene encoding a diguanylate cyclase (DGC) that synthesizes c-di-GMP to allosterically activate the glycosyltransferase BcsA. The expression of CsgD is itself tightly regulated, requiring the transcription factor MlrA, whose activity has been shown to be in turn crucially controlled by the c-di-GMP signaling network in *E. coli*.

In this work, and based on a multiple DGC mutant previously constructed in our laboratory, we are deciphering the c-di-GMP network controlling MlrA activity in *Salmonella*. Our preliminary work shows that MlrA does not need to form a complex with a DGC to activate *csgD* transcription. Also, we have used RNA sequencing (RNA-seq) to profile differential gene expression when comparing WT and *mlrA* and *csgD* mutants in order to uncover the full role of these transcriptional regulators in *Salmonella* biology. Results have shown a wide impact on *Salmonella* metabolism. We are undergoing mutant strains generation in order to analyze the role of selected genes in biofilm formation, expression and/or synthesis of the components of the biofilm extracellular matrix, and c-di-GMP levels.

Funding: Grant PID2021-127420NB-I00, MCIN/ AEI / 10.13039/501100011033 / FEDER, UE. L.A. is funded by the Program Formación de Profesorado Universitario, reference FPU22/02023.



Caracterización del papel de determinantes de virulencia en la interacción *Salmonella*-planta.

Fernando Baisón-Olmo, Nieves López-Pagán, Javier Ruiz-Albert, Carmen R. Beuzón.

IHSM (UMA-CSIC)

fbaison@uma.es, nieves.lpg@uma.es, javieruizal@uma.es, cbeuzon@uma.es

Salmonella enterica es un patógeno Gram negativo que produce gastroenteritis y fiebre tifoidea en diversos animales. Entre los mecanismos implicados en la virulencia de *S. enterica* encontramos a las adhesinas, las fimbrias, el lipopolisacárido (LPS), los dos sistemas de secreción de tipo III (T3SS-1 y T3SS-2), los sistemas de secreción de tipo VI (T6SS) y la metilasa Dam, la cual regula la expresión de varios factores de virulencia mediante la metilación de motivos GATC en los promotores de dichos factores de virulencia. En la mayoría de estos factores se ha observado que presentan heterogeneidad fenotípica, formando poblaciones biestables en las que solo una parte de la población total expresa un determinado gen.

En las últimas décadas se ha descrito la capacidad de *S. enterica* de colonizar plantas, estando implicados en este proceso algunos de los mismos factores responsables de la virulencia en animales. Hasta la fecha solo se ha analizado la posible heterogeneidad fenotípica en plantas para el flagelo, para cual se ha visto que presenta heterogeneidad con un perfil de expresión a nivel de población diferente al que presenta en medio de cultivo.

En el presente trabajo nos hemos propuesto caracterizar el papel que juegan los distintos factores genéticos, implicados en la virulencia en animales, en la interacción *Salmonella*-planta. Para ello hemos usado mutantes nulos de diversos factores (fimbria, LPS, adhesina, T3SSs, T6SS y metilasa Dam) en infecciones mixtas, junto al silvestre, en hojas de tomate (colonización de la superficie foliar) y de *Arabidopsis* (colonización del interior de la hoja o apoplasto) para determinar el papel en la supervivencia en planta mediante el cálculo del índice de competitividad (CI). También se han utilizado fusiones transcripcionales a fluoróforos para el análisis de la heterogeneidad fenotípica en medios LB, TM (extracto de hoja de tomate) y HIM (medio que emula las condiciones del apoplasto), tanto por citometría como por microscopía confocal de fluorescencia. Además, se ha estudiado el papel en la formación de biofilm en los medios LB, TM y HIM de los distintos factores de virulencia de *Salmonella enterica*.



Lack of RNase HI affects multiple traits associated with virulence in *Salmonella enterica*

Roberto Balbontín, Julia Jiménez-Espadafor, Gloria Álvarez-Alegre, Joaquín Bernal-Bayard and Francisco Ramos-Morales

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

rbalbontin@us.es

Bacterial virulence and antibiotic resistance are intertwined global challenges that can synergize, multiplying their adverse effects on health and economy^{1,2}. Two potential strategies to address this dual threat are non-biocidal inhibition of virulence traits (anti-virulence strategy)^{3,4} and manipulation of eco-evolutionary dynamics to hamper dissemination of antibiotic resistance in bacterial populations (anti-resistance strategy)^{5,6}. Successful design and implementation of these strategies require the identification of factors involved in bacterial gene expression, fitness and evolution. R-loops are RNA-DNA hybrids typically generated during transcription⁷ that strongly influence these traits⁸⁻¹⁴, as well as fitness of bacteria carrying antibiotic resistance mutations^{15,16}. The main enzyme responsible for degradation of R-loops, the RNase HI^{17,18}, is thus a potential target for anti-virulence and anti-resistance approaches. Indeed, the absence of RNase HI drives antibiotic resistant bacteria to extinction in populations with high initial frequency of resistance, both under laboratory conditions and during colonization of the murine gut¹⁶. Here we investigate the effects of RNase HI deficiency on traits associated with virulence in *Salmonella enterica*. We observed that loss of RNase HI alters expression levels of genes involved in virulence, both at population and single-cell levels, and causes defects in motility and biofilm formation. Moreover, we showed that the absence of RNase HI reduces the ability of *Salmonella* to survive within mammalian cells, which is consistent with the recently reported exacerbation of bacterial R-loops during intracellular growth¹⁹. Altogether, our results suggest that RNase HI could serve as a dual target for both anti-virulence and anti-resistance strategies, and provide a theoretical framework for the development of such approaches.

References

1. Antimicrobial Resistance Collaborators. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
2. Cepas, V. & Soto, S. M. *Antibiotics (Basel)* **9**, E719 (2020).
3. Ogawara, H. *J Antibiot (Tokyo)* **74**, 24–41 (2021).
4. Hotinger, J. A., Morris, S. T. & May, A. E. *Microorganisms* **9**, 2049 (2021).
5. Baquero, F., Coque, T. M. & de la Cruz, F. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3649–3660 (2011).
6. Andersson, D. I. *et al. FEMS Microbiol Rev* **44**, 171–188 (2020).
7. Thomas, M., White, R. L. & Davis, R. W. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2294–2298 (1976).
8. Cheng, B. *et al. FEMS Microbiol Lett* **221**, 237–242 (2003).
9. Poteete, A. R. *BMC Mol Biol* **10**, 14 (2009).
10. Shen, Y., Koh, K. D., Weiss, B. & Storici, F. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 98–104 (2011).
11. Naka, K., Koga, M., Yonesaki, T. & Otsuka, Y. *Mol Microbiol* **91**, 596–605 (2014).
12. Madike, N. Z., Tehrani, A. K., Wang, J. D. & Kreuzer, K. N. *Mol Microbiol* **91**, 39–56 (2014).
13. Tannous, E., Kanaya, E. & Kanaya, S. *Sci Rep* **5**, 9969 (2015).
14. Drolet, M. & Brochu, J. *DNA Repair (Amst)* **84**, 102693 (2019).
15. Moura de Sousa, J., Balbontín, R., Durão, P. & Gordo, I. *PLoS Biol* **15**, e2001741 (2017).
16. Balbontín, R., Frazão, N. & Gordo, I. *Mol Biol Evol* **38**, 3220–3234 (2021).
17. Tadokoro, T. & Kanaya, S. *FEBS J* **276**, 1482–1493 (2009).
18. Hyjek, M., Figiel, M. & Nowotny, M. *DNA Repair (Amst)* **84**, 102672 (2019).
19. Browning, K. R. & Merikh, H. *mBio* **15**, e0273723 (2024).

Funding

This research was funded by grant PID2019-106132RB-I00 from MCIN/AEI/10.13039/501100011033, grant P20_00576 from Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades from Junta de Andalucía, grant US-1380805 from Universidad de Sevilla, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades from Junta de Andalucía, María Zambrano fellowship and grant CNS2022-135955, from Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia «European Union-NextGenerationEU», and Emergia fellowship EMC21_00154, from Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades from Junta de Andalucía.



New peptidoglycan-related enzyme involved in the early stages of cell division

Aitana Beloso¹, Daniel Ballesteros¹, Víctor Hernandez-Rocamora², Alessandra Polissi³, Waldemar Vollmer^{2,4}, Manuel Pazos¹

¹ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM, CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

²Centre for Bacterial Cell Biology, Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

³ Dept. of Pharmacological and Biomolecular Sciences "Rodolfo Paoletti", University of Milano, Milano, Italy.

⁴ Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Australia.

abeloso@cbm.csic.es, mpazos@cbm.csic.es

Peptidoglycan synthesis is the process against which most antibiotics are aimed at. The coordination and regulation of the enzymatic activities involved, together with the inner and outer membrane biogenesis machinery, is critical to ensure robust growth of the cell envelope and integrity of the bacteria. The early stages of cell division, including the transition between cell elongation and cell septation, are mainly uncharacterized, and only few cell division proteins and peptidoglycan related enzymes are known to be critical for this stage of cell growth in *Escherichia coli*.

We have identified a novel peptidoglycan-related enzyme, a deacetylase named PcdA for peptidoglycan glycan chain deacetylase A, which appears to modulate the cleavage of the septal peptidoglycan during cell division. Amidases activity is required for cell constriction and eventual separation of two daughter cells. They are tightly regulated and coordinated during the cell cycle by different proteins, including EnvC and the cell division proteins FtsEX (in case of AmiA and AmiB), and NlpD and the Tol-Pal system (in case of AmiC). The Tol-Pal system is a multiprotein complex localized throughout the cell envelope, involved in different biological processes as outer membrane constriction or phospholipid transport, and which malfunctioning causes cell separation defects (cell chaining phenotype).

Although *pcdA* is not essential in standard growth conditions, the overproduction of a catalytically active PcdA causes a defect in amidase activation during cell division, as observed by the characteristic cell chaining phenotype. Supported by additional evidence, we suggest a role for PcdA during the early stages of cell division.



Conserved patterns in *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome in response to inter-species interactions in wine fermentations

Belen Benitez-Dominguez^{1,2*}, Sergio Izquierdo-Gea¹, Javier Ruiz¹, Alvaro Sanchez², Ignacio Belda¹.

¹Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid

²Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG-CSIC), Salamanca

belbendom@gmail.com

Wine fermentations harbour several yeast species, with *Saccharomyces cerevisiae* primarily driving the process. Understanding the molecular determinants of *S. cerevisiae* contribution to fermentation performance is crucial to producing tailored wines, leveraging and modulating the ecological dynamics (environmental conditions and interspecies interactions) within wine fermentations.

Our study examines how *S. cerevisiae* responds to interspecific biological interaction during wine fermentation, looking for conserved patterns on its transcriptome when interacting with a set of 6 different yeast species and their combination in communities of increasing diversity, and assess the extent of this response consistency when changing the chemical environment (i.e. nitrogen source availability).

We found a conserved response in *S. cerevisiae* to biological interaction, involving metabolic pathways related with secondary metabolite and amino acid biosynthesis, and oxidative phosphorylation. Genes associated with interspecific interaction were identified, particularly those related to thiamine, ammonium transport, and stress response. Even though the biological enrichment indicates a similar response across environmental conditions, limiting the nutrients availability to a single nitrogen source (ammonium) increased the number of genes responding to interspecies interaction in *S. cerevisiae*, indicating a heightened impact of biological interaction on *S. cerevisiae*'s transcriptome when performing in a more competitive environment. Interestingly, the transcriptional response of *S. cerevisiae* to limiting nitrogen sources were stronger in monoculture than as part of complex yeast consortia, which may be indicating a buffering effect of biotic interactions in response to environmental changes.

Finally, our investigation also explores whether specific response mechanisms of *S. cerevisiae* to individual species persist in contexts of increasing species, concluding that the individual effect of interacting species is diluted in high diversity contexts. Besides, we found an example of emergent response as consequence of higher-order interaction; meaning, finding a substantial increase in the number of differentially expressed genes in a second-order combination (*Torulaspora delbrueckii* and *Pichia kudriavzevii*) with *S. cerevisiae*, compared to interaction with the respective first order co-cultures.

These findings offer mechanistic insights into how biological interactions and fermentative conditions shape *S. cerevisiae* performance, with potential implications for optimizing fermentation and wine production.



Aislamiento, caracterización y análisis genómico de bacteriófagos líticos contra *Pseudomonas aeruginosa*

Patricia Bernabé-Quispe, Rosa Ana Espada-Zamora, Samara Sabsabi, M^a Del Pilar Marin-Muela, Marina Costa, Irene Cruz y M^a Ángeles Tormo-Mas

Instituto de investigación Sanitaria La Fe

patricia_bernabe@iislafe.es

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista responsable de una variedad de infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y con enfermedades crónicas.

El aumento creciente de la resistencia a los antibióticos ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas, como los bacteriófagos líticos, para el tratamiento de estas infecciones como uso compasivo. La terapia fágica presenta varias ventajas, los fagos son altamente específicos para ciertas especies o cepas bacterianas, son capaces de revertir la resistencia bacteriana a los antibióticos en algunas cepas multirresistentes, por ello la hacen atractiva como alternativa o complementaria a los antibióticos convencionales.

En este trabajo se aislaron bacteriófagos frente a cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes aisladas de pacientes del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, a partir de muestras de agua ambientales y residuales de diversas procedencias.

Tras su aislamiento, se llevó a cabo la caracterización de los fagos, secuenciando sus genomas y obteniendo sus morfologías mediante microscopía electrónica. Además, se realizó el análisis de sus secuencias para determinar que fueran óptimos para la terapia fágica tras demostrar la ausencia genes de virulencia y genes relacionados con la lisogénia. Asimismo, se realizó un análisis genómico comparativo, se determinó la cinética de infección y la evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y el pH. Para evaluar el rango de huésped de los fagos aislados, se seleccionaron 200 cepas clínicas multirresistentes relevantes.

Finalmente, se estudió su eficacia para prevenir la formación del biofilm, así como eliminar el biofilm preformado, mejorando su eficacia tras su encapsulación en nanoemulsión

Los fagos aislados tienen un potencial para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, Los resultados obtenidos tras la caracterización biológica y el análisis genético proporciona información útil para futuras investigaciones, que ayudarán a desarrollar cócteles de fagos y así ampliar la gama de bacterias objetivo y evitar la aparición de resistencias

Financiación: Proyecto PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto AICO/2021/306 financiado por la Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital de la Generalitat Valenciana.



T6SS de *Salmonella* Typhimurium: en busca del fenotipo perdido

Isela Serrano-Fujarte, Patricia Bernal, Francisco Ramos-Morales y [Joaquín Bernal-Bayard](#)

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

jbbayard@us.es

El sistema de secreción de tipo 6 (T6SS) es una nanomáquina bacteriana utilizada para inyectar efectores (toxinas) a sus hospedadores eucariotas o a otras bacterias, considerándose una potente arma antimicrobiana. *Salmonella* Typhimurium contiene un T6SS que contiene los 13 genes necesarios para que el sistema sea funcional, además de incluir otros genes de función desconocida. Otros T6SSs han sido bien caracterizados en patógenos como *Vibrio*, *Pseudomonas* o *Escherichia*, sin embargo, muchos aspectos tales como la activación del T6SS, su ensamblaje y papel biológico siguen siendo desconocidos para *Salmonella*.

Dada la relevancia clínica de este patógeno es de interés conocer en detalle los mecanismos de acción de su T6SS. No obstante, su estudio no ha sido trivial, ya que este sistema no se expresa en condiciones de laboratorio, debido a la acción represora que la proteína H-NS¹ ejerce sobre las regiones reguladoras de los genes del sistema. Unido a esto, existe cierta controversia en el campo sobre las señales ambientales y genéticas que conducirían a la activación de este sistema²⁻⁴. Por lo cual, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar diferentes herramientas que nos permitan estudiar la intrincada regulación del T6SS de *Salmonella*, explorar su papel biológico y caracterizar funcionalmente genes del *cluster* cuya función es aún desconocida.

Para ello, hemos creado fusiones transcripcionales de los dos principales promotores del *cluster* con el operón *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* y estamos examinando las señales ambientales y genéticas que impulsan la expresión del sistema en *Salmonella*. Además, se ha usado un enfoque bioinformático para identificar posibles efectores traslocados a través del T6SS que puedan tener un papel en la patogénesis o la competencia. Por otro lado, hemos generado una cepa de *S. Typhimurium* con un T6SS inducible artificialmente sustituyendo los dos promotores endógenos divergentes por los promotores P_{tac} y P_{BAD}. Esta estirpe nos permitirá realizar análisis funcionales para descifrar el papel biológico de elementos del sistema aún sin caracterizar.

Esta información nos permitirá entender la regulación y función del T6SS y dada su relevancia en la competencia microbiana, eventualmente se podrían identificar nuevos compuestos antimicrobianos.

Bibliografía:

1. Brunet, Y. R. *et al.* H-NS Silencing of the Salmonella Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits Salmonella enterica Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infect. Immun.* 83, 2738–2750 (2015).
2. Sibilini-Sousa, S. *et al.* A Family of T6SS Antibacterial Effectors Related to L,D-Transpeptidases Targets the Peptidoglycan. *Cell Rep.* 31, 107813 (2020).
3. Hespanhol, J. T., Nóbrega-Silva, L. & Bayer-Santos, E. Regulation of type VI secretion systems at the transcriptional, posttranscriptional and posttranslational level. *Microbiology* 169, (2023).
4. Sana, T. G. *et al.* Salmonella Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5044–E5051 (2016).

Agradecimientos: Proyecto PID2022-136863NB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y por proyecto CNS2022-136016 financiado por Ministerio de Ciencia e Innovación.



Killing machines in *Pseudomonas putida*: type VI secretion systems and extracellular membrane vesicles

Cristina Civantos, Javier de la Peña, Jose Manuel Borrero-de-Acuña, [Patricia Bernal*](#)

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

pbernal@us.es

Pseudomonas putida is a versatile bacterium known for its potential in environmental protection and biotechnological applications. Some of its secretion systems are particularly useful as antimicrobial weapons and are found in many biological control agents. The Type VI secretion system (T6SS) of *P. putida* is known to kill a broad range of bacteria, including resilient phytopathogens such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium caratovorum*, *Pseudomonas savastanoi* and *Xanthomonas campestris*¹. Other systems, such as the Type Zero Secretion System (T0SS), also known as Extracellular Membrane Vesicles (EMV), are involved in many essential tasks, including cell-cell communication and the exchange of genetic material and other molecules. More importantly, they can serve as vehicles for the secretion of toxins and antimicrobial compounds². A better understanding of the molecular mechanisms that control these secretion systems of *P. putida*, as well as the regulation of these systems, offers opportunities to exploit their potential for environmental protection. This understanding can facilitate the development of “a-la-carte” biocontrol agents with improved characteristics, such as toxicity and specificity. Interestingly, using customised EMVs can avoid living microorganisms, bypassing the limitations of genetically modified microorganisms to control diseases. All this knowledge will contribute to the development of sustainable agricultural practices to protect crops and reduce the impact of intensive agriculture.

References

¹Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A., and Llamas, M.A. (2017) The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal* 11: 972–987.

²Borrero de Acuña and Bernal P. (2021) Plant holobiont interactions mediated by the type VI secretion system and the membrane vesicles: promising tools for a greener agriculture. *Environmental Microbiology* 23: 1830-1836

Acknowledgements

PB is supported by the MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spanish agency through Ramon y Cajal RYC2019-026551-I and her laboratory is funded by three Research Grants from the State Subprogram for Knowledge Generation from the Spanish Minister of Science and Innovation (MCIN), the Spanish State Research Agency (AEI) and the European Union (UE) with reference PID2021-123000OB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE), TED2021-130357B-I00 and CNS2022-135585 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/“NextGenerationEU”/PRTR [The Spanish Recovery, Transformation and Resilience Plan]). PB and JMBA are also supported by a grant (Excellence Grant 2021) from the Andalusian Knowledge Agency (AAC) with reference ProjExcel_00450.



Culture media influences *Candida parapsilosis* growth, susceptibility, and virulence

Betsy Verónica Arévalo-Jaimes^{1,2}, Joana Admella^{1,2}, [Núria Blanco-Cabra](#)^{1,2} and Eduard Torrents^{1,2}

¹Bacterial Infections and Antimicrobial Therapies Group, Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Barcelona.

²Secció de Microbiologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona.

nblanco@ibecbarcelona.eu

Candida parapsilosis is a pathogenic yeast responsible for about 16% of *Candida spp.* infections, making it the second most frequent cause of candidemia, particularly problematic in neonates. Its ability to form biofilms, even in high-glucose environments, contributes to its increased incidence. However, its incapability to form true hyphae ends in smaller and less complex biofilms than those generated by other *Candida* species, and the role of pseudohyphal growth in its pathogenicity remains relatively unexplored. In this study, we investigated the metabolic adaptability of *C. parapsilosis* in response to nutrient availability by analyzing its growth, morphology, susceptibility, and *in vivo* virulence in planktonic and biofilm states under four different culture media. Our findings underscore the importance of establishing standardized culture conditions that mimic the natural infection environment. Overall, our study provides valuable insights into the intricate relationship between nutrient availability and *C. parapsilosis* pathogenicity.

This study was partially supported by grants PID2021-125801OB-100, PLEC2022-009356 and PDC2022-133577-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2017SGR-1079), the European Regional Development Fund (FEDER) and Catalan Cystic Fibrosis association. BVA-J is thankful to La Caixa Foundation (ID 100010434) for its PhD grant (LCF/BQ/DI20/11780040). JA thanks Generalitat de Catalunya for its financial support through the FI program (2021FI_B00118). N.B-C. acknowledges Ministerio de Universidades, Spain, for the Margarita Salas grant funded by the European Union-Next Generation EU.



Engineering membrane vesicles for the development of biopesticides and plant-growth promoting agents

Javier de la Peña Noya¹, Adrián Ruíz Camas¹, Patricia Bernal Guzmán¹ and José Manuel Borrero de Acuña^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Av. de la Reina Mercedes, no. 6, Sevilla, CP 41012, Spain

jbdeacuna@us.es

Membrane encased structures serve multiple biological functions in bacteria, including the formation of intracellular compartments and extracellular vesicles, which are essential for bacterial-bacterial communication and bacterial-host interactions¹. They also hold potential for biotechnological applications, especially in vaccine production, drug delivery, and valuable chemical production. Despite the tremendous advances in elucidating eukaryotic vesicle formation—endocytosis and exocytosis—and identifying key players, the proteins participating in this process in bacteria remain elusive².

Although a wide variety of bacterial processes can initiate vesicle formation, little information is available on the systems that coordinate the bacterial membrane's restructuring. We identified a family of uncharacterized proteins, which are highly conserved across species and actively promote both intra- and extracellular vesicle generation.

We investigated the impact of overproducing these proteins in *E. coli* and the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. The production of a protein group led to the formation of intracellular membranous compartments either tubular or globular, whereas the other group boosted extracellular vesicle release. The deletion of both genes in *P. aeruginosa* resulted in a substantial loss of vesicle formation. These results collectively pinpoint these two groups of proteins as active membrane re-shaping effectors, and it is to our knowledge the first report on active vesicle production in bacteria.

Our current work follows up the groundwork laid in *E. coli* and *P. aeruginosa* to harness the full potential of these membrane vesicles for biotechnological applications. Firstly, we will employ the interactomics techniques to identify the protein-protein interactions underlying the biogenesis of these structures in *P. putida*. Next, we will induce the expression of diverse interaction partners found in the interactomic studies to modulate vesicle formation. Finally, we will engineer the proteic cargo of these membrane vesicles to encapsulate phytopathogen inhibitors. These engineered membrane vesicles could potentially surrogate hazardous pesticides used in agriculture.

References: [1] Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13-24. [2] Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology*, 113(1), 1-11.

Acknowledgements: Our laboratory is funded by the PID2021-122395OA-I00, TED2021-130357B-I00, ProyExcel_00450 and EMERGIA20_00048.



Identificación del transportador de metionina de *Streptococcus suis*

Camila Bosch^{1,2}, Luis Saralegui^{1,2}, Carla García^{1,2}, Clara Marín^{2,3}, María Pilar Jiménez de Bagüés^{2,3}, Jesús Arenas^{1,2*}

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza y Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

jaarenas@unizar.es

S. suis es un patógeno porcino que causa alta mortalidad y pérdidas económicas en la industria porcina a nivel global. Estudios previos han identificado los genes esenciales para la infección estreptocócica, incluidos transportadores de la familia *ATP Binding Cassette* (ABC) que tienen una función importante en la adquisición de nutrientes. En este estudio analizamos uno de estos transportadores de identidad aun no esclarecida. Análisis genómicos identificaron que los genes responsables están organizados en un operón formado por 4 genes que codifican para una posible lipoproteína de unión al substrato (LipA), una permeasa y ATPasas. Análisis bioinformáticos mostraron que el operón está conservado en los genomas disponibles de *S. suis*, pero muestra diferencias con otros estreptococos. Para identificar su substrato, se creó un mutante en el gen que codifica para la lipoproteína en la cepa de referencia P1/7 de *S. suis*. La cepa salvaje y el mutante se cultivaron en medio químicamente definido en condiciones restrictivas de diferentes aminoácidos esenciales para el crecimiento bacteriano. Cuando el medio fue suplementado con diferentes concentraciones de metionina, la cepa salvaje mostró un crecimiento reducido a 0 y 5 mg/L de metionina, pero la cepa mutante no creció. Ensayos en Western-blotting usando un anticuerpo específico contra la lipoproteína, mostraron que su expresión fue inversamente proporcional a la concentración de metionina en el medio. Ensayos mediante citometría de flujo demostraron que la lipoproteína está expuesta en la superficie bacteriana. Para confirmar la función del transportador en la biología de la infección, se llevó a cabo una infección experimental en ratones CD1 utilizando un modelo de infección crónica intranasal. Los ratones se inocularon con la cepa P1/7 y el mutante, y al cabo de 3 días se determinó la cantidad de bacterias presentes en fosas nasales y órganos internos (bazo, corazón, pulmón y cerebro). No se detectaron diferencias en la cantidad de bacterias recuperadas de las fosas nasales entre la cepa salvaje y el mutante. La cepa salvaje se aisló de todos los órganos internos, pero no la cepa mutante. En resumen, nuestros ensayos indican que es un transportador de metionina relevante para la infección estreptocócica.



DSF Quorum Sensing regulatory cascade in *Stenotrophomonas maltophilia* coordinates virulence phenotypes through regulation of c-di-GMP levels

Marc Bravo^{1,2}, Celeste Gómez^{1,2}, Joan-Lluís Pons¹, Òscar Conchillo-Solé^{1,2}, Xavier Coves¹, Pol Huedo¹, Xavier Daura^{1,3}, Isidre Gibert^{1,2} and Daniel Yero^{1,2}

¹ Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

² Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

³ Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), E-08010 Barcelona.

marc.bravo@uab.cat

Stenotrophomonas maltophilia are environmental multi-drug resistant organisms that are increasingly associated with nosocomial infections in humans. In these bacteria the quorum sensing (QS) system is mainly based on the DSF (Diffusible Signal Factor) signal, and it plays a crucial role in coordinating bacterial population and serves as key regulatory mechanism for pathogenesis. *S. maltophilia* control DSF-QS communication via genes located in the *rpf* (regulation of pathogenicity factors) cluster. This cluster comprises essential enzymes involved in DSF synthesis, perception, and signal transduction, organized into two adjacent operons that are transcribed in a convergent manner. One operon consists of genes encoding the fatty Acyl-CoA ligase RpfB and the DSF synthase RpfF, while the other operon encodes a two-component system composed of the sensor kinase RpfC and the c-di-GMP phosphodiesterase response regulator RpfG. Activation of the quorum sensing system by DSF leads to biofilm dispersion and increased motility by regulating intracellular levels of the second messenger c-di-GMP, which binds to the transcription factor Clp, regulating its transcriptional activity. Individual mutants of each of the components of the system have been obtained and studied both phenotypically and functionally. The effect of these deletions on DSF and c-di-GMP levels was also determined. Mutants for *rpf* components and *clp* exhibit increased biofilm formation and reduced motility, except for *rpfB*, showing opposite phenotypes, as it is involved in DSF degradation. These phenotypes become more evident as one delves deeper into the regulatory cascade, reaching the transcription factor. The observed phenotypes are influenced by intracellular c-di-GMP levels and the activity of c-di-GMP-dependent transcriptional regulators. Although all individual mutants in the system modify c-di-GMP levels, the mutant lacking the phosphodiesterase, as the cascade ultimately leads to its activation, exhibits the highest c-di-GMP levels. Correlation of these phenotypes with transcriptomic profiles during peak DSF production has been established based on RNA-seq data. Furthermore, the RNA-seq data has enabled the determination of core genes regulated by the QS system as well as cellular processes and metabolic pathways. Additionally, other transcription factors regulated by Clp and indirectly by c-di-GMP levels have been identified and further studied. These advancements in *S. maltophilia* QS system functionality pave the way for novel strategies targeting virulence factors such as biofilm formation.

This work was funded by the Spanish MICINN (PID2019-111364RB-I00). We also thank Catalan AGAUR (2017 SGR1062 and 2021 SGR00092).



Identificación de proteínas de unión a RNA involucradas en fenómenos de diferenciación celular en cianobacterias

Manuel Brenes-Álvarez, Halie Rae Ropp, Frank Stein, Dimitrios Papagiannidis, Clement Potel, Mikhail Savitski, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor, Wolfgang Hess.

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Alemania.

manuel.brenes-alvares@biologie.uni-freiburg.de

La diferenciación de heterocistos en cianobacterias filamentosas y su cooperación con las células vegetativas en un mismo filamento es uno de los casos más antiguos de multicelularidad. Los principales reguladores de este proceso son factores de transcripción. Sin embargo, en los últimos años se han caracterizado transcritos no codificantes, como pequeños RNAs, que se expresan en un único tipo celular y participan en este proceso.

Las proteínas de unión a RNA (RBPs) son componentes centrales de las redes de regulación génica. Regulan la estabilidad de mRNAs, localizan espacialmente algunos mRNAs y funcionan como chaperonas de RNA ayudando en la interacción entre RNAs pequeños y su mRNAs diana. Sin embargo, no se conocen chaperonas de RNA funcionales en cianobacterias y sólo se ha caracterizado el papel de algunas RBPs en estos organismos.

En este trabajo hemos usado R-Deep/GradR¹ una metodología basada en el fraccionamiento de todos los complejos macromoleculares de la célula usando gradientes de sacarosa seguido de la identificación de las proteínas por espectrometría de masas. Si una proteína es parte de un complejo RNA-proteína, dicho complejo se dismantelaría tras un tratamiento con RNasa, por lo que al comparar muestras tratadas con RNasas con muestras no tratadas se observaría un movimiento aparente de la proteína en el gradiente. En este sentido, es importante resaltar que este tipo de procedimiento no sólo identifica RBPs sino cualquier proteína que esté unida a un complejo de RNA-proteína.

El análisis de nuestros datos arrojó 333 candidatos en la cianobacteria filamentosa *Nostoc* sp. PCC 7120. Para identificar los candidatos que estaban directamente unidos a RNA hemos usado inteligencia artificial para la predicción de RBPs. Hemos validado *in vivo* la capacidad de unir RNA de 6 nuevas RBPs cuya conexión con el RNA era previamente desconocida. Estas proteínas están relacionadas con procesos esenciales en estos organismos como la fotosíntesis, la biogénesis de los tilacoides o la diferenciación celular, planteando así la relevancia que los fenómenos de regulación post-transcripcional pueden tener a todos los niveles, incluyendo la correcta diferenciación de los heterocistos, un tipo celular especializado.

Financiación: Alexander von Humboldt Postdoctoral Fellowship, HE2544/20-1 DFG y PID2022-138128NB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033).

[1] Caudron-Herger M, et al. Identification, quantification and bioinformatic analysis of RNA-dependent proteins by RNase treatment and density gradient ultracentrifugation using R-Deep. *Nature Protocols* 15, 1338-1370 (2020).



Efecto de *Salmonella* sobre la biogénesis de ribosomas de células eucarióticas

Andrea Bullones-Bolaños, Joaquín Bernal-Bayard, Francisco Ramos-Morales.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

abullones@us.es

Salmonella enterica utiliza los sistemas de secreción de tipo III para translocar proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedadora. Los efectores alteran diferentes procesos celulares para promover la infección y garantizar la supervivencia de la bacteria, por lo que juegan un papel importante en la virulencia de *Salmonella*. Nuestro laboratorio estudia una familia de efectores con actividad E3 ligasa de ubiquitina (SlrP, SspH1 y SspH2) con el objetivo de identificar el conjunto de proteínas ubiquitiladas en una célula (ubiquitinoma) en presencia de estos efectores. Para ello, expresamos los tres efectores en células HEK293T y realizamos una purificación por afinidad de las proteínas ubiquitiladas, con ello hemos sido capaces de identificar por espectrometría de masas sustratos potenciales de los efectores. El análisis bioinformático de las proteínas identificadas muestra un enriquecimiento en proteínas relacionadas con distintos procesos celulares, entre ellos la biogénesis de ribosomas. Para estudiar el papel que tienen los efectores en este proceso se expresó cada uno de ellos bajo el control de un promotor inducible con galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*. Observamos que la expresión de SspH1 inhibe el crecimiento de la levadura tanto en medio sólido como en medio líquido. A continuación, queremos estudiar los perfiles de polisomas de las levaduras que expresan los efectores de *Salmonella* para dilucidar el rol de estas ligasas de ubiquitina sobre la biogénesis de ribosomas.

Agradecimientos: Proyecto PID2022-136863NB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa.



Reconstruction of the biodegradation pathway of naproxen in microbial consortia by means of metagenomic expression studies.

Inés Canosa¹, Juan A. Martínez-Mancebo¹, Zaki Saati-Santamaría^{2,3}, Pilar Navarro-Gómez¹, Maitane Juárez-Mugarza¹, Amando Flores¹

¹ Universidad Pablo de Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo/ Consejo Superior de Investigaciones Científicas/ Junta de Andalucía (UPO/CSIC/JA), Carretera de Utrera, Km. 1. 41013 Seville, Spain, ² Dept. de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España, ³ Institute for Agribiotechnology Research (CIALE), Villamayor, Salamanca, Spain.

icanper@upo.es

Emerging contaminants are defined as any chemical of synthetic or natural origin that is commonly monitored in the environment and has ecological and potentially adverse human health effects. Such pollutants include pesticides, heavy metals, chemicals, and certain pharmaceuticals of global concern, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs like naproxen (NPX). To date, wastewater treatment plants (WWTPs) have not been able to prevent this environmental threat, as even very low concentrations can cause toxicity and endocrine disruption in humans and aquatic life. We have isolated four bacterial consortia by several successive enrichment processes in a medium containing NPX as the sole carbon source, from the Copero wastewater treatment plant in Seville. We found that there was a positive correlation between the growth of the consortia and the degradation of the anti-inflammatory agent, confirming their ability to use it as the sole carbon source for their growth and to degrade it completely. We have also analysed the contribution of co-metabolism to optimise the use of NPX in one of these consortia. To date, we have not been able to isolate a single strain capable of using the compound alone, suggesting that more than one bacterium is required to degrade this drug. To understand the microbial mechanisms underlying this biodegradation, we performed shotgun metagenomic and RNA-seq analyses combined with mass spectrometry on the intermediates of the biodegradation pathway. These approaches will allow us to define the microbial composition of the consortia, elucidate the biodegradation pathway followed by them, and characterise the ecology and relationships between the bacterial strains present in the consortia.

This work has been funded by the Programa de Excelencia de la Junta de Andalucía (ProyExcel_00358),



Phylogenetically related *Bacillus* species trigger a differential metabolic shift that drives a shared beneficial response in melon plants

Carrévalo-Ríos, L¹; Molina-Santiago, C¹; Berlanga-Clavero, MV¹; Pineda-Dorado, M²; Barón-Ayala, M²; Dorrestein, P³; de Vicente, A¹ & Romero, D¹

¹IHSM-CSIC-UMA / Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

³University of California San Diego, Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center, La Jolla, USA

luisacarregalo@uma.es

Plant-beneficial microbes are known to provide multifaceted traits to the plant health. *Bacillus* species, frequently found within the plant holobiont, are known to enhance seed germination, promote plant growth, and bolster defense mechanisms against phytopathogens^[1], although the molecular shifts underlying these processes remain unstudied. Prior data has shed light into the topic, concluding that seed treatments lead to metabolic changes in adult plants, a process where the components of the extracellular matrix of *Bacillus subtilis* play a crucial role^[2]. In this work, we hypothesize that this metabolic reprogramming at seed level is conserved between closely related *Bacillus* species. To evaluate this, an in-depth analysis of the metabolic profile of whole plants emerged from seeds treated with either *Bacillus subtilis* or *Bacillus velezensis* was carried out. We describe the different metabolomic patterns found according to the part of the plant, focusing specially on the different leaves and the sections of the stem, identifying tryptophan and alkaloids, in the case of *B. subtilis*, and a shift in the pool of lipids, for *B. velezensis*, as key metabolites in the specific response of each bacterium. Ultimately, we evaluated different abiotic and biotic stressors on plants emerged from seeds treated, finding an enhancement of the resistance of the adult plants in any case. Moreover, plants emerged from seeds treated with *B. velezensis* showcase a slowed-down program of development that does not compromise their favorable response to stressors. These findings suggest that two different plant growth and resistance developmental programs triggered by closely related *Bacillus* species may occur toward a common goal.

[1] Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1327–1350). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

[2] Berlanga-Clavero, M. V., Molina-Santiago, C., Caraballo-Rodríguez, A. M., Petras, D., Díaz-Martínez, L., Pérez-García, A., de Vicente, A., Carrión, V. J., Dorrestein, P. C., & Romero, D. (2022). *Bacillus subtilis* biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon. *Nature Microbiology*, 7(7), 1001–1015. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01134-8>

This work was supported by grants from ERC Starting Grant (BacBio 637971), the National Plan de I+D+I of Ministerio de Economía y Competitividad (PID2019-1077242GB-I00) and Junta de Andalucía, Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) (P20_00479).



Identificación De Genes Clave Para La Colonización Intestinal Por Enterococos Multirresistentes

Gloria Carruana¹, Alejandra Flor-Duro¹, Belen Iglesias¹, Anna Quirant¹, Javier Pons¹, Vincent De Maat², Willem Van Schaik², Carles Ubeda^{1,3}

1. Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana - FISABIO, Valencia, España
2. Department of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Países Bajos
3. CIBER en Epidemiología y Salud Pública, Madrid, España

gloriacarru@gmail.com

Las bacterias multirresistentes, como el *Enterococcus faecium* Resistente a la Vancomicina (ERV), son un problema cada vez mayor en los pacientes hospitalizados. Las infecciones causadas por ERV suelen comenzar por la colonización del tracto intestinal. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los genes codificados por ERV que son necesarios para la colonización del intestino. Este conocimiento es absolutamente necesario para desarrollar nuevas terapias que prevengan la colonización y posteriores infecciones producidas por ERV en pacientes. En este estudio hemos utilizado una novedosa metodología basada en la generación de una librería de mutantes por transposición, unido a la secuenciación de alto rendimiento (TnSeq), con el fin de identificar genes codificados por ERV que son necesarios para la colonización del tracto intestinal. Además, hemos realizado análisis metatranscriptómicos en ratones con el fin de verificar la expresión *in vivo* por ERV de genes necesarios para la colonización intestinal. Nuestro análisis mediante TnSeq sugiere que aproximadamente el 10% de los genes codificados por ERV afectan a su capacidad de colonizar el intestino en ratones. De entre estos, se identificaron 79 cuya disrupción reduce significativamente (>2 veces) la capacidad de colonización de ERV en 3 colonias distintas de ratones, lo que refuerza su papel en la colonización intestinal, el cual es independiente de la microbiota presente en cada colonia. Por último, el efecto en la colonización intestinal de algunos de los genes identificados por TnSeq fue confirmado mediante mutagénesis dirigida y ensayos de competición, utilizando un modelo de ratón. Nuestros resultados han identificado diversos genes codificados por ERV que son clave para colonizar el intestino y que podrán servir en un futuro como dianas terapéuticas para prevenir infecciones producidas por ERV, patógeno que es resistente a la mayoría de los antibióticos disponibles hasta la fecha.

Financiación

PID2020-120292RB-I00

FPU20/07636



La importancia del análisis de células individuales en el estudio de la resistencia a antibióticos

Rocío Carvajal-Holquera, María Antonia Sánchez-Romero

Dpto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

rcarvajal1@us.es

En el siglo XX, los antibióticos revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, actualmente, la resistencia a antibióticos es un problema de salud global. Se estima que para 2050, 10 millones de muertes serán producidas por esta causa. Las terapias actuales no tienen en cuenta la presencia de subpoblaciones capaces de sobrevivir a la exposición a antibiótico y la prevalencia de aislados clínicos heteroresistentes (células susceptibles y resistentes dentro de una población isogénica) es cada vez más elevada. Las técnicas de análisis de células individuales nos permiten estudiar cómo responde cada célula a diferentes agentes antimicrobianos y pueden ayudarnos a combatir los problemas de resistencia a antibióticos. En este estudio, se han utilizado la microencapsulación de células individuales de *Salmonella enterica* y la citometría de flujo para estudiar la resistencia a carbapenémicos y fluoroquinolonas, dos de las familias de antibióticos más utilizadas como terapias de primera línea en hospitales.

La citometría de flujo nos permite analizar la heterogeneidad fenotípica existente en una población isogénica tras la exposición a antibióticos ya que analiza la expresión de diferentes genes implicados en la resistencia a antibióticos (bombas, porinas o proteínas involucradas en la respuesta general a estrés) en células individuales. Por otra parte, mediante la microencapsulación de células individuales de *Salmonella enterica* y posterior crecimiento en presencia de antibióticos podemos estudiar la reversibilidad de un fenotipo resistente. La combinación de ambos procedimientos proporciona información sobre la presencia de subpoblaciones en las células procedentes de una misma colonia, así como la expresión diferencial de genes implicados en la susceptibilidad a antibióticos, y revela la presencia de mecanismos mutacionales y no-mutacionales responsables de la resistencia a antibióticos.



Molecular and structural insights into the functionality of the quorum-sensing signal synthase RpfF in *Stenotrophomonas maltophilia*

Juan Camilo Ortiz^{1,2}, Oscar Conchillo-Solé^{1,2}, Marc Bravo^{1,2}, Joan Lluís Pons¹, Lucía Sánchez-Alba¹, Xavier Coves¹, Andrómeda-Celeste Gómez^{1,2}, David Reverter¹, Xavier Daura^{1,3}, Daniel Yero^{1,2}, and Isidre Gibert^{1,2}

¹ Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

² Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

³ Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), E-08010 Barcelona.

Oscar.Conchillo@uab.cat

Stenotrophomonas maltophilia emerges as an opportunistic multi-drug-resistant pathogen of considerable medical importance. These Gram-negative bacteria are widely present in the environment and exhibit intrinsic antimicrobial resistances and significant phylogenetic diversity. The quorum sensing system (QS) in these bacteria governs resistance and virulence phenotypes such as biofilm formation. The QS in *S. maltophilia* is mainly based on a fatty acid known as the Diffusible Signal Factor (DSF) which acts as the autoinducer and is sensed by a two-component system. The protein RpfF is the enzyme that synthesizes DSF and RpfG is the sensor histidine kinase. RpfF belongs to a crotonase family that possesses both desaturase and thioesterase activities. We had previously demonstrated that among *S. maltophilia* strains there are two genetic variants of these proteins (RpfF/G-1 and RpfF/G-2) that show different QS-related phenotypes. We first studied individual model strains mutated in both proteins of both variants. Phenotypically all mutants showed increased biofilm-forming capacity and decreased motility, although these phenotypes were more pronounced in the RpfF/G-1 variant. The transcriptome of all these mutants showed that half of the differentially expressed genes in the RpfF/G-1 strains were also found to be deregulated in the RpfF/G-2 strains. We also solved the 3D structure of RpfF-1 (PDB code 7ZQ7) presenting an asymmetric unit with two homotrimers of the RpfF-1 molecules. Each monomer presents an N-terminal α/β core domain and a C-terminal α -helical region with a structure highly similar to each other (rmsd from 0.5 to 0.6 Å vs chain A). Structural comparison with a protein model of the RpfF-2 variant resulted in a RMSD of 1.3Å, with all but two residues superposed were 53% of them are identical. Interestingly only the region from D62 to S71 of RpfF-1 contains most of the structural changes. This region is not involved in the interaction with either the sensor protein RpfC or the DSF. Finally, the interaction between RpfF and REC-domain of RpfC was detected using a bacterial two-hybrid assay. These findings together open the possibility to study and quantify the RpfF/RpfC-REC interactions in both genetic variants and will provide clues for a better understanding of the DSF-based QS mechanism in *S. maltophilia*.



Regulación de genes de virulencia cromosómicos mediante antiterminación por proteínas codificadas en islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.

Marina Costa, Mercedes Cervera-Alamar, Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Irene Cruz, Guillermo García-Lainez y M^a Ángeles Tormo-Mas

Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

marina_costa@iislafe.es

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son elementos genéticos móviles (EGMs) que codifican factores de virulencia como genes relacionados con la resistencia a los antibióticos, con la formación del biofilm, la adaptación al hospedador y producción de superantígenos o toxinas, como la del síndrome del shock tóxico (TSST-1), y que pueden ser movilizados a través de bacteriófagos, ejerciendo de esta forma un importante rol en su patogenicidad.

En el presente estudio se ha demostrado que, aparte de estas funciones conocidas de las SaPIs, estas son capaces de regular la expresión de genes cromosómicos del huésped, incluidos genes de virulencia. Mediante ensayos transcripcionales por *tiling array* y RT-qPCR en cepas de *S. aureus* con SaPIs se identificó un aumento de expresión en el operón *crtOPQMN* (responsable de la biosíntesis del carotenoide estafloxantina (STX) que además actúa como antioxidante en la defensa del patógeno frente al sistema inmune del hospedador) y en el gen *gnat* (con dominio acetiltransferasa relacionado con resistencia a antibióticos aminoglicósidos) entre otros.

Se identificaron las proteínas PtiA-M codificadas en las SaPIs como responsables de dicha sobreexpresión al estudiar la producción de STX, resultados que fueron validados mediante RNA-seq. El análisis del perfil de expresión del operón *crtOPQMN* y las zonas flanqueantes en presencia y en ausencia de la SaPI sobreexpresada, así como la obtención de diversos mutantes, determinó que la sobreexpresión se debía a un mecanismo de antiterminación cuya expresión comenzaba y terminaba respectivamente en los genes *isaA* y *copA*, demostrando que se producía la cotranscripción tanto del operón como de los genes flanqueantes.

Finalmente se confirmó el rol de STX como factor de virulencia mediante un ensayo de supervivencia en macrófagos que resultó en una disminución de la fagocitosis determinada por la sobreexpresión de PtiA-M. De esta forma se demuestra la multifuncionalidad de genes codificados en SaPIs que son capaces de afectar a la expresión génica de genes cromosómicos, incluidos genes de virulencia, a través de un mecanismo de antiterminación.

Financiación: Proyectos SAF2017-82251-R y PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa.



Reinterpretación de datos genómicos mediante biología funcional: El sistema de virulencia PhoPR de *M. tuberculosis*

Estefanía Crespo-Yuste, Ainhoa Arbués y Jesús Gonzalo-Asensio*

Grupo de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza

ecyuste@unizar.es

*correspondence to: jagonzal@unizar.es

La tuberculosis es causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). El sistema de dos componentes PhoPR ha demostrado ser clave para la virulencia del MTBC (1-3). No obstante, estudios genómicos muestran interpretaciones divergentes sobre el papel de mutaciones en PhoR. Un primer estudio demostró que una mutación en *phoR* conlleva la pérdida de función del sistema (3). Un estudio posterior identificó una acumulación de mutaciones no sinónimas en PhoR que, hipotéticamente, están bajo selección positiva en aislados clínicos de *M. tuberculosis* (4).

Para arrojar luz sobre estas observaciones, nos propusimos investigar el impacto en la virulencia de *M. tuberculosis* de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) de PhoR identificados en cepas clínicas (4). Tras descartar las variantes sinónimas, y aquellas que ya habían sido caracterizadas previamente (3), seleccionamos los 4 SNPs no sinónimos más frecuentes: 2 localizados en el dominio sensor de PhoR y 2 en el dominio catalítico de unión a ATP.

Las variantes del operón *phoPR* portando los SNPs seleccionados fueron clonadas en un plásmido integrativo. Dichas construcciones fueron usadas para complementar una cepa mutante $\Delta phoPR$ de *M. tuberculosis*. La funcionalidad del sistema PhoPR en estas cepas recombinantes fue analizada mediante qRT-PCR de algunos genes regulados por PhoPR (*pks2*, *pks3* y *mrc7*). Tres de las cuatro mutaciones estudiadas presentaron una expresión de los genes disminuida, equivalente a la de la cepa mutante $\Delta phoPR$, mientras que una de ellas mostró un nivel de expresión intermedio. Esta pérdida de función del sistema PhoPR en las 3 variantes se confirmó mediante estudios de proteómica, que mostraron la ausencia de secreción de ESAT-6, siendo éste el principal factor de virulencia del MTBC. Actualmente, estamos llevando a cabo un estudio de la virulencia de las variantes de PhoR en un modelo de infección en macrófagos humanos.

Nuestros resultados revelan que mutaciones en PhoR identificadas en estudios genómicos conllevan una pérdida de función de este sistema de virulencia, lo que excluye una ventaja evolutiva.

1 Gonzalo-Asensio et al. J. Biol. Chem. 2006

2 Walters et al. Mol Microbiol 2008

3 Gonzalo-Asensio et al., PNAS 2014

4 Chiner-Oms et al. Sci. Adv. 2019



Movilización de factores de virulencia codificados en islas de patogenicidad por bacteriófagos endógenos en cepas de *Staphylococcus spp* procedentes de infecciones asociadas a dispositivos médicos

Irene Cruz, Marina Costa, Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Mercedes Cervera-Alamar, Amparo Valentín y M^a Ángeles Tormo-Mas

Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Universitat Politècnica de València-Universitat de València.

Unidad Mixta de Investigación en Nanomedicina y Sensores. Universitat Politècnica de València-Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

irencruz@hotmail.es

Entre las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria destacan aquellas asociadas a dispositivos médicos (IAD). Estas suponen una grave amenaza para la salud pública, especialmente cuando son causadas por microorganismos multirresistentes a antibióticos.

Entre los principales patógenos causantes de IAD destaca *Staphylococcus spp*. Entre ellos, los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) han emergido como agentes etiológicos significativos en las IAD, especialmente en pacientes con prótesis ortopédicas y catéteres intravasculares. Una de las características clave de los SCN es su capacidad para adherirse a las superficies biológicas y a los dispositivos médicos, formando biopelículas resistentes a los antimicrobianos y al sistema inmunitario del huésped, las cuales actúan como reservorios de bacterias, permitiendo la persistencia de la infección y la recurrencia después del tratamiento antimicrobiano.

Estos microorganismos se caracterizan además porque codifican una gran variedad de factores de virulencia en elementos genéticos móviles (EGMs) que son diseminados por transferencia horizontal. Algunos ejemplos son genes relacionados con la resistencia a antibióticos, involucrados en la formación de biofilm, o producción de toxinas o superantígenos.

Tras realizar la secuenciación del genoma de cepas de SCN procedentes de infecciones de catéter o prótesis articulares de pacientes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia se estudió la presencia y estructura genética de islas de patogenicidad (IP) y bacteriófagos atemperados con el fin de detectar posibles factores de virulencia codificados por estos EGMs. Así, se observaron y caracterizaron genes relacionados con resistencia a antibióticos y a metales pesados que no habían sido descritos con anterioridad en EGMs de SCN.

Además, se estudió el mecanismo de movilización de IP por bacteriófagos atemperados corresidentes en cepas de *Staphylococcus epidermidis*, el cual determina la transferencia horizontal de los factores de virulencia codificados por estas IP y por tanto su diseminación. Estos mecanismos tienen por tanto implicaciones significativas en la epidemiología y la patogénesis de las enfermedades infecciosas, como conducir a la emergencia de cepas bacterianas más virulentas o resistentes a los tratamientos antimicrobianos, lo que complica el tratamiento y control de las infecciones.

Financiación: Programa Advanced Materials (MFA/2022/053) financiado por MCIN con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.11) y por la Generalitat Valenciana. Proyecto PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa.



Cyclic di-GMP controls virulence and antimicrobial resistance plasmid conjugal transfer in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*

Rubén de Dios, Lyuboslava Harkova, Ronan R. McCarthy

Division of Biosciences, Department of Life Sciences, Centre of Inflammation Research and Translational Medicine, College of Health and Life Sciences, Brunel University London, Uxbridge, UB8 3PH, UK.

ruben.dediosbarranco@brunel.ac.uk

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is listed by the World Health Organisation as a critical priority pathogen, for which novel therapeutics are urgently needed. *A. baumannii* is able to form strong biofilms that help it tolerate antimicrobial treatment. Despite the relevance of this pathogen, little is known about how it regulates biofilm formation or virulence. Here, we aim to elucidate how the second messenger cyclic di-GMP (cdGMP) controls biofilm formation in this species. We used the multidrug resistant (MDR) clinical isolate *A. baumannii* AB5075 and applied genetic tools to control its cdGMP levels. These included a chromosomal neutral-site insertion of the heterologous diguanylate cyclase *pleD** or the phosphodiesterase *rocR* under an inducible promoter. To validate that these enzymes were changing the AB5075 global cdGMP levels, we adapted a cdGMP fluorescent biosensor for its use in MDR *A. baumannii*. After this, we performed a differential RNA-seq (dRNA-seq) to uncover the cdGMP-driven global transcription changes and its targets, comparing cells expressing either *pleD** or *rocR* (high versus low cdGMP). This revealed that cdGMP directly upregulates genes involved in surface attachment and production of exopolysaccharide matrix. Additionally, cdGMP produced the downregulation of the genes implicated in twitching motility. These phenotypes were validated experimentally by performing biofilm formation and exopolysaccharide production assays, as well as twitching motility experiments. Experimentally, we also observed an increased conjugal transfer of the native antimicrobial resistance (AMR) plasmid p1AB5075 in this strain correlating with high cdGMP conditions. Interestingly, this increase occurred both when the high-cdGMP population was the donor or the recipient in the conjugation experiment. This indicates that cdGMP-dependent regulation mediates the spread of plasmid-borne antibiotic resistance genes. Lastly, we established that high cdGMP levels correlate with a lower virulence of AB5075 *in vivo* in *G. mellonella*. Our results demonstrate that cdGMP signalling controls biofilm formation in the critical-priority pathogen *A. baumannii* to the detriment of motility. Furthermore, this higher biofilm formation correlates with an increased plasmid transfer and a reduced virulence *in vivo*. Altogether, these results point at cdGMP regulation as a target for anti-virulence strategies in *A. baumannii*.



When resistance begets resistance: Antibiotic resistance mutations promote bacterial evolvability through an increase in recombination

Ignacio de Quinto¹, Ana-Isabel Rodríguez-Rosado³, José R. Valverde², Pablo García², Paula Ramiro-Martínez¹, Alvaro San Martín⁶, José-Manuel Rodríguez-Martínez^{4,5}, Alvaro Pascual^{4,5}, Jesús Blázquez², and Jerónimo Rodríguez-Beltrán^{1,7}

¹Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS); Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. ²Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, Spain; ³Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Seville, Spain; ⁴Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain; ⁵Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ⁶Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas-CIBERINFEC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

idequintoc@gmail.com

Antibiotic resistance (AR) is an inevitable consequence of bacterial evolution. The classical paradigm states that antibiotics exert a selective pressure that drives the rise of resistant bacteria. This selective pressure also favors bacteria showing an increased ability to evolve and gain new resistance. However, the existence of AR mutations that directly enhance bacterial evolvability is still undescribed.

Here, we report that clinically relevant quinolone-resistance *gyrA* mutations (i.e., S83L and D87G) cause a significant increase in recombination rate in *Escherichia coli* human isolates. Using a supercoiling fluorescent reporter, we demonstrate that this increase in recombination is mediated by alterations in supercoiling levels that may alter the accessibility of RecA to ssDNA. We show that these enhanced recombination rates translate into an increased ability to evolve resistance by merging together different TEM β -lactamase alleles. We then reasoned that strains carrying quinolone-resistance *gyrA* mutations should show signatures of increased recombination rates and AR. To test this hypothesis, we inferred recombination events from more than 4,000 *E. coli* high-quality genomes from public databases. Our analyses indicate that strains with clinically relevant *gyrA* mutations display signs of enhanced recombination and increased presence of AR, demonstrating that *gyrA*-mediated increase in recombination rates is pervasive across natural *E. coli* strains.

Together, our results contribute to explaining the high prevalence of quinolone-resistance mutations and provide, for the first time, direct evidence of antibiotic-resistance mutations that produce a direct increase in evolvability, fostering AR evolution.



Análisis de los niveles de ATP en cianobacterias en célula individual

Carlos Diaz-Ceballos¹, Alfonso Mendaña¹, Victor Campa¹, Daniel E Volke², Pablo I Nickel² y Raul-Fernandez Lopez¹

1. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria-CSIC, Santander, Spain
2. The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Kgs Lyngby, Denmark

diazc@unican.es

Los niveles de ATP en cianobacterias regulan una gran variedad de procesos fisiológicos importantes, como la progresión de su propio ciclo circadiano. El ATP es una molécula inestable propensa a sufrir una rápida degradación, lo que dificulta la obtención de medidas precisas de sus concentraciones intracelulares. En este trabajo, desarrollamos un sensor de ATP ratiométrico basado en la subunidad épsilon de la ATP sintasa de *Bacillus*. Este biosensor proporciona una estimación de los niveles intracelulares de ATP mediante la medición de la fluorescencia de una molécula de GFP circularmente permutada siendo posible obtener valores de manera cuantitativa. Validamos el rendimiento de este biosensor en *E. coli* y lo introducimos en el genoma de la cianobacteria *S. elongatus*, nuestro organismo de estudio, obteniendo una cepa en la que los niveles intracelulares de ATP pueden ser monitoreados utilizando microscopía de célula viva. Al medir estos niveles en diferentes condiciones de iluminación, demostramos la interrelación entre los niveles de ATP obtenidos como respuesta a la intensidad de la luz proporcionada a las cianobacterias.



tRNA queuosine modification is involved in biofilm formation and virulence in bacteria.

Jorge Díaz-Rullo y José Eduardo González-Pastor

Centro de Astrobiología (CAB, CSIC-INTA)

jdiaz@cab.inta-csic.es

gonzalezpje@cab.inta-csic.es

Transfer RNA (tRNA) modifications represent one of the multiple mechanisms involved in fine-tuning regulation of protein translation¹. Queuosine (Q) is a hypermodified nucleoside that replaces guanosine at the anticodon loop of certain tRNAs. Although its physiological role is elusive, evidence supports the idea that Q-tRNAs regulate the rate of translation at NAU codons²⁻⁴. Therefore, we hypothesize that expression of genes enriched in these codons (Q-genes) would be specially affected by Q-tRNA modification. Here, we show that Q can regulate in bacteria the translational efficiency of Q-genes *in vivo*. Using a novel bioinformatic analysis, we have predicted Q-genes in multiple bacterial species, revealing enrichment in functions especially related to adhesion, biofilm formation, sporulation, virulence and pathogenesis widely in bacteria, and particularly in human pathogens. Indeed, we experimentally verified that these processes were significantly affected by altering the degree of tRNA Q-modification in different model bacteria, such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. These findings represent the first report of a general mechanism controlling biofilm formation and virulence in Gram-positive and Gram-negative bacteria possibly through the coordination of the expression of functionally related genes. Moreover, considering that different bacterial species can either produce or salvage Q, we propose that an imbalance between the two populations may affect to the availability of Q and impact in the functionality of microbiomes. In this sense, we report that human diseases related to microbiome dysbiosis could be promoted by this imbalance. Altogether, our findings open the door to the control of bacterial infections and biofilm formation by inhibition of tRNA Q-modification.

1. Agris, P.F., Narendran, A., Sarachan, K., Väre, V.Y.P., and Eruysal, E. (2017). The importance of being modified: the role of RNA modifications in translational fidelity. *Enzymes*, 41, 1-50. 10.1016/bs.enz.2017.03.005.
2. Morris, R.C., Brown, K.G., and Elliot, M.S. (1999). The Effect of Queuosine on tRNA structure and function. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 16, 757-774. 10.1080/07391102.1999.10508291.
3. Tuorto, F., Legrand, C., Cirzi, C., Federico, G., Liebers, R., Müller, M., Ehrenhofer-Murray, A., Dittmar, G., Gröne, H., and Lyko, F. (2018). Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *EMBO J.*, 37, e99777. 10.15252/embj.201899777.
4. Kulkarni, S., Rubio, M., Hegedúsová, E., Ross, R., Limbach, P., Alfonzo, J., and Paris, Z. (2021). Preferential import of queuosine-modified tRNAs into *Trypanosoma brucei* mitochondrion is critical for organellar protein synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 49, 8247-8260. 10.1093/nar/gkab567.



Comparación funcional de los secretomas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 y *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 1448a: identificando estrategias de virulencia y mecanismos de interacción con el huésped.

Domínguez-Cerván, Hilario^{1,2}; Díaz-Martínez, Luis³; Ramos, Cayo^{1,2}; Rodríguez-Moreno, Luis^{1,2}.

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos s/n, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

²Dpto. Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Extensión Campus de Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), E-29010 Málaga ³Unidad de Bioinformática, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

lqrodriguez@uma.es

La bacteria fitopatógena *Pseudomonas savastanoi* es el agente causal de enfermedades en huéspedes leñosos y herbáceos de interés agronómico y ornamental. La especie *P. savastanoi* engloba 7 patovares denominados según el huésped del que se han aislado sus cepas [1]. Para este trabajo hemos empleado cepas de los patovares *savastanoi* (Psv) y *phaseolicola* (Pph), aisladas de olivo (*Olea europaea*) y de judía (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente. Aunque ambas bacterias fitopatógenas presentan factores de virulencia específicos, como la síntesis de auxinas y citoquininas por Psv [2] y la producción de faseolotoxina por Pph, ambas comparten la capacidad de translocar proteínas efectoras al interior de las células vegetales mediante un sistema de secreción tipo III (T3SS). Además del T3SS, las bacterias Gram-negativas presentan mecanismos adicionales para secretar proteínas al espacio extracelular [3]. En este trabajo hemos caracterizado, mediante espectrometría de masas, el secretoma de las cepas Psv NCPPB 3335 y Pph 1448a, así como de sus mutantes en los genes *hrpA*, implicado en la síntesis del pili del T3SS, y *hrpL*, principal regulador de los elementos estructurales y funcionales del T3SS. Del total de proteínas identificadas, se seleccionaron las que contenían péptido señal para su secreción, se descartaron aquellas con regiones hidrofóbicas y se filtraron según su localización subcelular, obteniéndose 321 proteínas secretadas independientemente del T3SS en Psv y 274 en Pph. Mediante análisis bioinformáticos funcionales comparativos detectamos 34 funcionalidades comunes entre Psv y Pph, correspondientes a 144 proteínas en Psv y 140 en Pph. A pesar de existir diferencias en la abundancia de estas proteínas, la redundancia funcional es elevada, lo que representaría el conjunto de proteínas fundamentales para el mantenimiento bacteriano durante la invasión del huésped. A su vez, el análisis funcional comparativo entre Psv y Pph mostró 28 funcionalidades exclusivas de Psv, representadas por 69 proteínas, y 13 funcionalidades exclusivas de Pph, representadas por 32 proteínas. En este caso, las proteínas exclusivas identificadas representarían aquellas estrategias diferenciales y dependientes de huésped. En definitiva, este estudio avanza en la caracterización funcional del contenido proteico liberado durante la infección por Psv y Pph, aportando conocimientos sobre las estrategias adaptativas de estas bacterias a sus diferentes huéspedes.

Financiado por los proyectos PID2020-115177RB-C21/AEI/10.13039/501100011033 (MICINN-FEDER) y P20-00122 (Junta de Andalucía-FEDER), y por el contrato predoctoral PRE2021-099113 (MICINN).

- [1] Caballo-Ponce, E., Pintado, A., Moreno-Pérez, A., Murillo, J., Smalla, K., and Ramos, C. (2021).. *Phytopathology* 111, 1277–1288. doi:10.1094/PHYTO-11-20-0526-R.
- [2] Surico, G., Iacobellis, N. S., and Sisto, A. (1985).. *Physiol. Plant Pathol.* 26, 309–320. doi:10.1016/0048-4059(85)90006-2.
- [3] Green, E. R., and Meccas, J. (2016). *Virulence Mech. Bact. Pathog.*, 213–239. doi:10.1128/9781555819286.ch8.



Descifrando el rol del factor sigma *sigC* como sensor de intensidad lumínica en *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Marina Domínguez-Quintero, Alfonso Mendaña, Raquel Gutiérrez-Lanza, Juan Manuel Medina, Víctor Campa and Raúl Fernández-López

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC). Universidad de Cantabria.

dominguezm@unican.es

Los organismos vivos se encuentran sometidos a las continuas oscilaciones ambientales producidas por la sucesión del día y la noche, por lo que han desarrollado mecanismos de anticipación basados en ciclos circadianos. El ciclo es un mecanismo rítmico de regulación endógena que se sincroniza con la hora solar. De esta forma, los organismos adaptan su fisiología a los ciclos de luz y oscuridad. Uno de los modelos clásicos de regulación circadiana es la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (*Syne1* PCC7942). Asimismo, el crecimiento de las cianobacterias se encuentra limitado por factores ambientales, siendo la intensidad luminosa uno de los principales. Para sobrevivir, estos microorganismos autótrofos deben combinar la información externa sobre la irradiancia con el ciclo circadiano interno que domina la expresión génica durante el día y la noche. En *Synechococcus*, el ciclo controla la expresión de casi el 70% del genoma, y muchos factores sigma se expresan de forma circadiana. En este trabajo demostramos que el factor sigma *sigC*, previamente implicado en el control circadiano, responde específicamente a la intensidad luminosa, reprimiendo su expresión en condiciones de alta irradiancia. Nuestros resultados identifican este factor sigma como la intersección donde convergen intensidad luminosa y reguladores circadianos, sugiriendo que el control circadiano puede estar íntimamente ligado a la detección ambiental.



Conjugative-killer plasmids, a novel antimicrobial alternative

Pedro Dorado-Morales¹, Morgan Lamberieux¹, and Didier Mazel¹

¹Unité Plasticité du Génome Bactérien, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

pedro.dorado-morales@pasteur.fr

Targeted killing of pathogenic bacteria without harming beneficial members of host microbiota holds promise as a strategy to cure disease and limit both antimicrobial-related dysbiosis and development of antimicrobial resistance. Recent work from our lab has demonstrated that genetic modules based on toxin-intein systems delivered by conjugation are highly effective antimicrobials agents, able to selectively kill *Vibrio cholerae* in mixed populations [1]. In this line of work, we are adapting the aforementioned system to other pathogens of clinical importance by including new toxin modules whose expression depends on transcriptional factors that are exclusively present in the targeted bacteria. The chosen bacteria and their selected specific transcriptional regulators are: *Salmonella enterica* and HilD, the master regulator of the invasion process [2]; *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* and VirF, the primary regulator of the virulence phenotype in both species [3]. Additionally, to ensure an efficient dissemination and maintenance across the microbial gut population, we are engineering conjugative plasmids, such as RP4, to be transferred and maintained between different constituents of the gut microbiome. Finally, once validated under laboratory conditions, we will test the in-vivo performance of the generated plasmid(s) either to eliminate a specific disease-causing pathogen or as a probiotic agent against pathogenic colonisation. In the first scenario, we will measure the clearance capability of our system on an already established infection, while in the second we will monitor the resistance to pathogen colonisation of a plasmid-carrying microbiota.

[1] López-Igual, R., *et al.* (2019). *Nature Biotechnology* 37(7):755-760

[2] Smith, C., *et al.* (2016). *mBio* 7(5)

[3] Lan, R., *et al.* (2003) *Infection and Immunity* 71(11):6298-6306



Species-specific regulation of biofilm development in staphylococci is mediated by a small RNA derived from the 3' UTR of *icaR*.

Maitte Echeverz, Saioa Burgi, Amaia Sabalza, Jaione Valle, Iñigo Lasa.

Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-
Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

maite.echeverz@unavarra.es

Exopolysaccharide production is a metabolically expensive process that requires tight regulation. *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* differ in their regulation of the production of the exopolysaccharide (1-6) poly N-acetylglucosamine (PIA/PNAG) in response to environmental conditions. In the absence of the sigma factor σ^B , which modulates the stress response, *S. epidermidis* does not produce PIA/PNAG, whereas *S. aureus* produces more of it. Here we show that this behaviour is exclusively dependent on the 3' UTR region of the *icaR* gene. The 3' UTR of *icaR* produces a 250 nt RNA, which we have named *icaS*. *icaS* is required for the expression of the *icaADBC* operon and in its absence there is no synthesis of PIA/PNAG. The expression of *icaS* depends on the presence of σ^B in *S. epidermidis*, whereas its expression is independent in *S. aureus*. *icaS* homologs are produced in the 3' UTR of *icaR* in different staphylococcal species. These results suggest that *icaR* is a regulatory module containing a repressor protein that prevents the uncontrolled expression of the *icaADBC* operon and a sRNA whose presence is necessary for the expression of the *icaADBC* operon once *icaR* repression has disappeared. The combination of two elements with opposite functions in the same module ensures that the *icaADBC* operon is never expressed if *icaR* is not present to control its level of expression.



Interpretable regulatory motifs incorporating flexible elements and DNA structural features

Elia Mascolo¹, Quinn Mood¹, Erik Blázquez Fernández², Álex Velasco Cañete de Cardenas², Raül Gómez Buisan³, [Ivan Erill](mailto:ivan.erill@uab.cat)^{2,1}

¹ Department of Biological Sciences, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, MD, USA

² Departament d'Enginyeria de la Informació i de les Comunicacions, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

³ Universitat Oberta de Catalunya, Barcelona, Spain

ivan.erill@uab.cat

Bacterial cells must coordinate gene expression in response to changes in their environment. Transcription factors (TF) regulate gene expression by binding to specific sequence patterns, known as motifs, in the vicinity of target genes. The computational study of transcriptional regulatory networks (TRN) is predicated on the availability of models describing the DNA binding affinity of transcription factors. Motif discovery algorithms have been developed to efficiently locate overrepresented sequence patterns in sets of sequences targeted by a transcription factor. These methods assume that binding affinity is adequately modeled by considering short contiguous segments of DNA represented by a rigid position frequency matrix. Many bacterial transcription factors, however, act as oligomers and target multipartite sequence patterns located at variable distance. Furthermore, prokaryotic transcription factors are also known to rely on structural properties of DNA, such as minor groove width, to identify their targets. As a consequence, the transcriptional regulatory networks defined by these transcription factors cannot be effectively studied with bioinformatics approaches, curtailing our understanding of the evolution and regulation of many molecular pathways in bacteria. Here we describe a new model of DNA binding affinity that extends conventional matrix models through the incorporation of flexible connections among sub-motifs and direct recognition of DNA shape features into a log-likelihood ratio framework. We show how this model can be incorporated into a genetic programming framework to perform discriminative motif discovery and recover complex, DNA sequence- and structure-based motifs from sets of unaligned sequences. These complex motifs can then be used to scan genomes and reconstruct their corresponding transcriptional regulatory networks *in silico*, enabling the study of their evolution. The formal derivation of this new model using a log-likelihood framework guarantees that the inferred affinity models are intuitively modular, comparable across transcription factors and directly interpretable by users.



Identificación de nuevas rutas genéticas que sustentan la función de los telómeros durante gametogénesis

Rodrigo Esteban Villafañe y Alfonso Fernández-Álvarez

Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC/Universidad de Salamanca). Calle Zacarías González 2, 37007 Salamanca, España.

rodrigoev24@gmail.com

Los telómeros representan la parte final de los cromosomas lineales en las células eucariotas. Están compuestos por una secuencia repetitiva de ADN rica en guaninas junto con un complejo de proteínas específicas teloméricas. Sus funciones más importantes son resolver el problema de la replicación del final del cromosoma, así como, evitar que estas regiones sean reconocidas por la maquinaria de reparación de daño en el ADN. Sin embargo, los telómeros desempeñan otra función mucho menos conocida, aunque igual de primordial, que es la formación del bouquet telomérico meiótico. Cómo los telómeros adquieren las características moleculares para formar un bouquet es un proceso muy poco conocido. En este estudio nosotros llevamos a cabo un escrutinio masivo usando la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* donde hemos conseguido mimetizar la formación del bouquet en mitosis. Gracias a un análisis masivo de interacciones genéticas usando una librería de 3300 mutantes simples en genes no esenciales hemos identificado nuevas rutas genéticas de las que depende la formación del bouquet. Dada la conservación evolutiva de los telómeros y la formación del bouquet en meiosis, nuestros resultados amplían el conocimiento sobre los procesos de diferenciación celular y gametogénesis.



Epidemiología molecular de BLEEs en un entorno *One Health*

Javier F Favieres¹, Jose F Delgado-Blas¹, Carlos Serna¹, Mario Pulido-Vadillo¹, Bosco R Matamoros¹, Natalia Montero¹, Rafel Bazán², Teresa Blanco Cacho³, Miguel Ángel Pezzi⁴, Ulises Ameyugo⁵, Rocío Fernández Urrusuno⁵ y Bruno Gonzalez-Zorn¹

¹Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

²Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía

³Dirección General de Planificación y Recursos Hídricos, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía

⁴Área de Gestión Sanitaria Serranía de Ronda. Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucía

⁵Dirección General de Salud Pública y Ordenación Farmacéutica, Consejería de Salud y Consumo, Junta de Andalucía

fferna10@ucm.es

La resistencia a antibióticos es una amenaza crítica para la salud humana, animal y ambiental. Por lo tanto, es fundamental entender como los genes responsables fluyen entre estos compartimentos. El objetivo de este proyecto es estudiar las dinámicas de transmisión de genes de resistencia entre humanos, animales y el medio ambiente. Se utilizó como modelo *Escherichia coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

Se tomaron 250 muestras de: granjas de cerdos (10 granjas intensivas y extensivas, 110 muestras), pacientes hospitalarios (35 muestras), el matadero municipal (23 muestras), estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR, 2 estaciones, 18 muestras), aguas residuales urbanas (11 puntos, 33 muestras) y aguas naturales (3 ríos, 36 muestras; 3 pozos, 18 muestras). Utilizando medios selectivos con cefalosporinas, se aisló un total de 238 *E. coli* productores de BLEEs. Todos los aislados se secuenciaron con la tecnología *Illumina* y una proporción significativa de ellos también por *Oxford Nanopore Technology*.

Respecto al contenido en BLEEs, el 76% de los aislados portaba *bla*_{CTX-M-15} o *bla*_{CTX-M-32} (182/238). Sin embargo, los aislados clínicos y de aguas residuales mostraban mayor heterogeneidad, con *bla*_{CTX-M-15} en el 36% (28/77) de los aislados, *bla*_{CTX-M-32} en el 22% (17/77) y *bla*_{CTX-M-27} en el 15% (12/77). En aislados porcinos, se encontró *bla*_{CTX-M-32} en el 77% (118/152) de los genomas.

ST131 era el secuenciotipo dominante en aislados humanos y antropogénicos, mientras que se vio más variabilidad en aislados porcinos. Se hallaron varios secuenciotipos en ambos ambientes, incluyendo ST38, ST410 y ST414. Los análisis de alineamiento del genoma completo revelaron una relación muy cercana entre aislados humanos y porcinos pertenecientes a ST38. En aislados secuenciados con la tecnología *Nanopore*, se observaron plásmidos portadores de BLEEs muy similares provenientes de ambientes diferentes.

En conclusión, el estudio de un ecosistema mínimo nos permite, por primera vez, determinar la transmisión de clones de *E. coli* y elementos genéticos móviles entre humanos, animales y el medio ambiente.

Esta comunicación es parte del proyecto PLEC2023-010275, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/



Papel de la metilación del ADN en la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli*

Fernández-Fernández Rocío y Sánchez-Romero María Antonia

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

rocio-ff@us.es

La resistencia a antibióticos es considerada uno de los mayores retos sanitarios del siglo XXI. Los mecanismos genéticos y bioquímicos clásicos no logran explicar por completo las bases moleculares de la resistencia a antibióticos. Trabajos recientes sugieren que la metilación del ADN puede ser clave en este proceso. En bacterias, la metilación del ADN es una señal epigenética que participa en procesos celulares esenciales para las bacterias, como la regulación del ciclo celular, la virulencia, la reparación del ADN o la regulación de la transcripción, y contribuye a la formación de subpoblaciones fenotípicamente diferentes dentro de poblaciones isogénicas. Su naturaleza transitoria y reversible convierte a la metilación del ADN en un fenómeno muy interesante desde el punto de vista de la resistencia a antibióticos.

En este trabajo, se han estudiado más de 400 aislados clínicos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos y analizado el número de copias de los genes de las ADN metiltransferasas, enzimas encargadas de la metilación de bases. Sorprendentemente, la variación en el número de copias de estas metilasas en los genomas de aislados clínicos resistentes a antibióticos difiere de la encontrada en aislados susceptibles. Así mismo, la secuenciación por nanoporos de algunos de los aislados sugiere una fuerte correlación con los niveles de metilación. Por otro lado, el análisis del porcentaje de similitud entre las copias de las metilasas ha desvelado que las copias “extra” no son duplicaciones de las copias originales. Su localización en el genoma no es azarosa, sino que sigue un patrón similar en todos los aislados estudiados. Debido a que la aparición y pérdida de genes de metilasas, así como el intercambio de sus dominios por recombinación pueden causar nuevos patrones de metilación en los genomas bacterianos, la presencia de copias “extra” de metilasas en aislados clínicos resistentes a antibióticos podría estar modificando el paisaje epigenético. Por lo tanto, entender el papel de la metilación del ADN en el control de la susceptibilidad a ciertos antimicrobianos podría ayudarnos a combatir la resistencia a antibióticos diseñando nuevas estrategias terapéuticas.



Relaxasas conjugativas como vehículo para el envío de sistemas CRISPR-Cas

Andrea Fernández-Gómez¹, Dolores L. Guzmán-Herrador¹, David Bikard², Matxalen Llosa^{1*}

1. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria (UC), and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), UC – CSIC – SODERCAN, Santander, Spain
2. Institut Pasteur, Paris, France

matxalen.llosa@unican.es

Los sistemas CRISPR-Cas y sus derivados, como los editores de bases, son herramientas ampliamente utilizadas en edición genética. Sin embargo, una de sus principales limitaciones es el envío de sus componentes a las células diana. Se sabe que el envío y expresión del gen *cas* puede dar lugar a toxicidad y efectos *off-target*. Además, en bacterias esta limitación es especialmente importante en aquellas especies recalcitrantes a la transformación. El envío de complejos ribonucleoproteicos purificados es una alternativa viable, pero más costosa y metodológicamente compleja.

Es por ello que proponemos el uso de la conjugación bacteriana como estrategia para el envío de sistemas CRISPR-Cas. Durante este proceso, unas proteínas conocidas como relaxasas conjugativas son translocadas a través de un Sistema de Secreción Tipo IV a una célula receptora, unidas covalentemente a la hebra de ADN transferida. La conjugación tiene como ventaja su amplio rango de hospedadores potenciales, de modo que desde una donadora como *Escherichia coli* se puede enviar ADN a diversos géneros receptores, tanto Gram– como Gram +.

En este trabajo hemos logrado fusionar la relaxasa TrwC con Cas12a, y hemos comprobado que la fusión puede ser traslocada a una célula receptora, donde mantiene su actividad endonucleasa en presencia de un gRNA. Además, hemos demostrado también que dicho gRNA puede ser codificado en el plásmido que se transfiere durante la conjugación. Dicho plásmido también puede proporcionar un molde para la recombinación homóloga, permitiendo ediciones específicas.

Dada la utilidad de los editores de bases a la hora de generar mutaciones puntuales, hemos ampliado nuestra herramienta generando fusiones entre las relaxasas TrwC y MobA y un CBE (*cytosine base editor*), y hemos demostrado que estas fusiones pueden enviarse también por conjugación y generar modificaciones precisas en las receptoras en presencia de un gRNA, que también puede estar codificado en el plásmido transferido.

Con todo ello, hemos logrado generar un sistema de envío in vivo y autónomo, en el cual todos los elementos necesarios para dar lugar a una edición se proporcionan desde una bacteria donadora, lo que en el futuro permitirá modificar cepas silvestres de interés.



Caracterizando la producción de celulosa por *Starkeya* sp. STN1A a partir de CO₂

Fernández-González, Rocío; Pacheco-Sánchez, Daniel; Castillo-Rodríguez, Inés; Martirani-von Abercron, Sophie-Marie; Marín, Patricia; Marqués, Silvia

Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

rocio.fernandez@eez.csic.es; silvia@eez.csic.es

Entre los gases de efecto invernadero, el dióxido de carbono (CO₂) es la principal causa del calentamiento global en la tierra y del progresivo cambio climático. Uno de los retos sociales más importante es conseguir en los próximos años una reducción significativa de sus emisiones. En nuestro laboratorio hemos aislado una bacteria, *Starkeya* sp. STN1A, que es capaz de emplear una gran diversidad de fuentes de carbono para crecer, incluido el CO₂, y producir abundante celulosa a partir de ellas [1, 2]. Disponer de una cepa capaz de fijar CO₂ y convertirlo en un compuesto de valor añadido, como es la celulosa bacteriana, constituye una contribución importante a la captura y recuperación de CO₂. Hemos determinado que dicha capacidad de fijar CO₂ se debe a la presencia en el genoma de los complementos genéticos completos para la fijación de CO₂ a través del ciclo de Calvin-Benson-Bassham basado en la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), siempre y cuando se le proporcione un donador de electrones apropiado. Este puede ser un compuesto reducido de azufre, para lo cual tiene dos rutas de oxidación: *sox* y *sor*. Alternativamente, el poder reductor se puede obtener de la oxidación de hidrógeno, para lo cual tiene un *cluster* de hidrogenasas. Asimismo, la bacteria presenta en su citoplasma unos compartimentos proteicos, carboxisomas, que generalmente constituyen un mecanismo de concentración de CO₂. Se han generado mutantes dirigidos para confirmar el papel de los genes esenciales que participan en la fijación de CO₂. Paralelamente se ha analizado mediante PCR cuantitativa la expresión de dichos genes y se ha comparado con la expresión en una fuente de carbono orgánica, como la glucosa. Además, se están caracterizando las estructuras identificadas como carboxisomas, con el fin de determinar su composición proteica. Para ello estamos utilizando ensayos de inmunolocalización de la RuBisCO, así como análisis de interacciones proteicas.

Referencias

- [1] Marín P, Martirani-Von Abercron SM, Algar I, Castañeda-Cataña M, Pacheco-Sánchez D, Eceiza A, Marqués S. 2019. *Microb Biotechnol* **12**:662-676. [doi: 10.1111/1751-7915.13399](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13399)
- [2] Martirani-Von Abercron SM, Marín P, Solsona-Ferraz M, Castañeda-Cataña MA, Marqués S. 2017. *Microb Biotechnol* **10**:1781-1796. [doi: 10.1111/1751-7915.12842](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12842)

Agradecimientos

Este trabajo es parte de los proyectos PID2020-113144RB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033, y PLEC2021-008210 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/ PRTR.



Uso del sistema de la GFP tripartita en levadura para estudiar la interacción de efectores bacterianos con proteínas implicadas en la respuesta innata humana

Alejandro Fernández-Vega, Elba del Val, Isabel Rodríguez-Escudero, María Molina y Víctor J. Cid.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid e Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRyCIS), Madrid.

alejfe06@ucm.es

Los dominios TIR son plegamientos estructurales presentes tanto en procariontes como en receptores y adaptadores del sistema inmunitario (receptores de tipo Toll, TLRs). En nuestro laboratorio hemos caracterizado previamente los efectores translocados por el sistema de secreción de tipo 4 (T4SS) de *Brucella abortus* BtpA y BtpB (de *Brucella TIR-domain containing proteins*) utilizando el modelo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una vez secretados al interior de la célula hospedadora, estos efectores interfieren con la señalización mediada por TLRs.

En este trabajo presentamos la puesta a punto de un sistema de GFP tripartita que permite detectar interacciones proteína-proteína en *S. cerevisiae*. Este sistema está constituido por tres componentes: el "barril" de GFP sin las láminas beta-10 y -11 (GFP 1-9), incapaz de emitir fluorescencia *per se*; y las dos proteínas de interés cuya interacción se quiere determinar, una de ellas fusionada a la lámina beta-10 de GFP y la otra a la beta-11. Si se produce la interacción entre ambas proteínas, las láminas beta-10 y -11 se encontrarán lo suficientemente cerca para reconstituir la GFP y reestablecer su fluorescencia *in vivo*.

En este estudio, evaluamos tanto la interacción homo-oligomérica de BtpA y BtpB como la interacción hetero-oligomérica de ambos efectores con distintos adaptadores de rutas de TLRs (MyD88, TRAM, TIRAP y TRIF), así como de versiones truncadas de dichos efectores conteniendo únicamente su dominio TIR. El modelo confirmó las interacciones previamente descritas y reveló diferencias tanto de intensidad de fluorescencia como de localización subcelular de las versiones truncadas con respecto a las proteínas Btp completas. Por último, el estudio de dos mutantes de pérdida de función de BtpB (BtpB^{S126P} y BtpB^{Y225C}) con dichas proteínas de las rutas TLR, demostró una alteración de su capacidad de interacción.

Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del sistema de GFP tripartita en levadura para realizar rastreos sencillos que evalúen la capacidad de efectores bacterianos de interactuar con proteínas humanas en el entorno de la célula eucariótica, aportando además información sobre el compartimento subcelular donde se produce la interacción, proporcionando así una valiosa herramienta para estudios moleculares en interacción hospedador-patógeno.

Este trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2022-138591NB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/. A. F.-V. disfruta de un contrato del Programa de Empleo Joven de la Comunidad de Madrid CT4122PEJ-2021-AIBMD-21971.



La microbiota intestinal facilita la generación de nuevas cepas multirresistentes mediante la transferencia de plásmidos conjugativos

Candela Fuster González^{1*}, Beatriz Herrera ¹, María José Garzón ¹, Asmus Kalckar Olesen ², Clara Megías ¹, Blanca Martín ¹, Soren Johannes Sorensen ², Carles Ubeda ^{1,3}

1. Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio), Valencia, España
2. Departamento de Biología, Universidad de Copenhague, Copenhague, Dinamarca
3. Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) Epidemiología y Salud Pública, Madrid, España.

[*cfustergonzalez@gmail.com](mailto:cfustergonzalez@gmail.com)

La diseminación de genes de resistencia mediante plásmidos conjugativos es un mecanismo fundamental de generación de cepas multirresistentes. Esta diseminación se podría producir de manera eficiente en el intestino debido a la elevada densidad y diversidad bacteriana existente (la microbiota intestinal). A pesar de su importancia, se desconocen los factores que promueven la diseminación de plásmidos conjugativos en la microbiota intestinal, así como las bacterias que participan en adquirirlos, conservarlos y transferirlos. En este estudio hemos implementado una nueva metodología que nos permite estudiar la diseminación de plásmidos conjugativos desde una cepa donadora (*Escherichia coli*) a bacterias de la microbiota. Concretamente, hemos introducido en un plásmido conjugativo un gen que codifica para la proteína verde fluorescente y un gen que confiere resistencia a cloranfenicol. La expresión de ambos genes está controlada por un mismo promotor. Ambos genes no se expresan en la cepa donadora, ya que contiene un represor del promotor, pero sí en las cepas receptoras. Mediante citometría de flujo, crecimiento en medios selectivos y secuenciación del gen 16S demostramos *ex vivo* la transferencia y persistencia del plásmido conjugativo en múltiples bacterias comensales; principalmente pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y en menor medida a la clase Bacteroidia. Más aun, mediante un modelo de ratón en el cual simulamos la colonización por enterobacterias multirresistentes tras el tratamiento antibiótico y la restauración de la microbiota mediante el trasplante fecal, demostramos que esta terapia es efectiva en la eliminación de enterobacterias multirresistentes, pero promueve la generación de nuevas bacterias multirresistentes mediante la diseminación de plásmidos a las bacterias trasplantadas. Nuestros resultados demuestran la transferencia de genes de resistencia a través de plásmidos conjugativos entre bacterias de la microbiota intestinal e indican un potencial efecto negativo de terapias basadas en la restauración de la microbiota: la generación de nuevas cepas multirresistentes.

Agradecimientos:

CIPROM/2021/053



Mutaciones naturales en una región rica en adeninas afectan a la producción de un regulador transcripcional de membrana en *Staphylococcus aureus*

Coral García-Gutiérrez, Ane Muruzabal-Galarza, Alejandro Toledo-Arana

Instituto de Agrobiotecnología (IdAB-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Gobierno de Navarra, Avenida de Pamplona 123, Mutilva (Navarra).

coral.garcia@csic.es

Las mini-proteínas (SPs) presentan un tamaño inferior a los 50 aminoácidos y han sido sistemáticamente omitidas por los algoritmos de anotación de los genomas. Recientemente, los análisis RIBO-seq están permitiendo revelar los pequeños marcos de lectura (smORFs) que codifican las SPs y que constituyen el proteoma oculto de los organismos. Mediante esta tecnología, nuestro grupo ha confirmado la traducción de 89 SPs en *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos bacterianos de mayor relevancia clínica. Sin embargo, solo 36 de ellas se encontraban anotadas en el genoma de referencia de esta bacteria. En este trabajo, nos centramos en una SP desconocida que está localizada en la región 5' del mRNA de SAOUHSC_01289, que codifica una proteína hipotética con similitud a los reguladores transcripcionales XRE (TR¹²⁸⁹). La mini-proteína SP¹²⁸⁹ presenta un dominio transmembrana (TMD), sugiriendo su localización en la membrana bacteriana. Mediante fusiones traduccionales con diferentes etiquetas, revelamos que solo se producía SP¹²⁸⁹ y no TR¹²⁸⁹, a pesar de estar codificadas en el mismo mRNA. Analizando detalladamente la secuencia, descubrimos que SAOUHSC_01289 carece de una RBS clara, sugiriendo que la ORF TR¹²⁸⁹ no es funcional por sí misma. No obstante, justo antes del codón stop de SP¹²⁸⁹ existe una región rica en adeninas (As), que son susceptible de sufrir mutaciones durante la replicación del ADN. Por ello, realizamos análisis comparativos de secuencia entre todos los genomas de *S. aureus* secuenciados y confirmamos variaciones en el número de As en dicha región, que generaban diversas pautas de lectura. Curiosamente, el 99,68% de los genomas contenían 6 y 7 As que generaban codones stop, resultando en la producción de SP¹²⁸⁹ exclusivamente, mientras que el 0,36% presentaban 5 y 8 As, que resultaban en la fusión de ambas ORFs, SP¹²⁸⁹ y TR¹²⁸⁹, generando un posible TR que incluía el TMD (SP-TR¹²⁸⁹). Los ensayos de localización subcelular confirmaron que tanto SP¹²⁸⁹ como SP-TR¹²⁸⁹ se localizan en la membrana. Actualmente, estamos realizando análisis de expresión global para determinar los genes controlados por este nuevo regulador de membrana y determinar cuáles podrían ser sus señales de activación. Además, estamos estudiando la frecuencia de variación de fase en SP¹²⁸⁹.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación a través de los proyectos PID2019-105216GB-I00 y PID2022-136696NB-I00.



¿Profilaxia conjugativa? Nuevos factores de inhibición de la fertilidad contra plásmidos de amplio rango de hospedador

Daniel García-López¹, Sheila González-Gutiérrez¹, Fernando de la Cruz¹ y M. Pilar Garcillán-Barcia¹

¹Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (CSIC-UC), 39011, Santander, España

garciald@unican.es

Los elementos genéticos móviles (MGE), especialmente los plásmidos, provocan un impacto masivo en el fenotipo, ecología y evolución de las bacterias que los portan [1]. Por ello, tienen un papel fundamental en la adquisición y propagación de resistencias antimicrobianas. En este contexto de preocupación global por el incremento de cepas multirresistentes se hace necesaria la búsqueda de estrategias que impidan su transmisión sin ejercer presión selectiva [2]. En la naturaleza, los MGE establecen interacciones que modulan sus dinámicas de transferencia [3]. La inhibición de la fertilidad representa una de estas interacciones, en donde un plásmido impide la transmisión de otro plásmido co-residente no emparentado. En este trabajo, hemos realizado una búsqueda bioinformática de factores de inhibición de la fertilidad, previamente descritos como ejemplos aislados, ofreciendo una visión más amplia de su distribución en Unidades Taxonómicas de Plásmidos (PTU) y cromosomas. Hemos estudiado su rango de actividad contra una batería de plásmidos conjugativos y movilizables, y seleccionado aquellos factores que eran efectivos contra plásmidos de amplio rango de hospedador para esclarecer su mecanismo de acción. Asimismo, hemos generado y analizado una colección de plásmidos mutantes capaces de escapar de la inhibición de la fertilidad. Con todo ello, buscamos no solo incrementar el arsenal de herramientas con las que luchar contra la dispersión de resistencias antimicrobianas, sino también esclarecer los bases moleculares de la inhibición de la fertilidad.

Referencias:

[1] Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R. *et al.* *Nat Rev Microbiol* **19**, 347–359 (2021).

[2] Baquero, F., Coque, T. M. & Cantón, R. *Expert Opin. Ther. Targets.* **18**, 851–861 (2014).

[3] Getino, M. & De La Cruz, F. *Microbiol. Spectr.* **6**, 6.1.03 (2018).

Financiación:

Ministerio de Universidades (FPU21/05415); Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto PID2020- 117923GB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033).



Análisis de la evolución que sufren los sistemas de dos componentes para conferir la capacidad de adaptación a nuevos entornos.

Begoña García¹, Nahiara Garmendia¹, Maite Echeverz¹, Beatriz Álvarez², Luis Ángel Fernández-Herrero² e Iñigo Lasa¹

¹Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

²Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco. Madrid

begona.garcia@unavarra.es

Las bacterias detectan cambios ambientales y se adaptan a ellos utilizando los sistemas de dos componentes (TCS). Distintas especies bacterianas presentan en sus genomas un número diferente de TCS que está relacionado con la cantidad de nichos que son capaces de colonizar o la complejidad de su ciclo celular.

Los TCS tienen una modularidad intrínseca marcada por la especificidad entre HK y RR y por la especificidad de las respuestas fisiológicas que regulan. Durante la evolución, las bacterias han ido adquiriendo nuevos TCS lo que les permite adaptarse y colonizar nuevos ambientes o ser más eficientes en un determinado ambiente. La adquisición de nuevos sistemas se produce por un proceso de duplicación de un TCS ya existente o por transferencia horizontal desde otro organismo. Las reglas que rigen los cambios que tienen que producirse en un TCS para diferenciarse del TCS del que procede (duplicación) o para reconocer las dianas en el nuevo huésped (transferencia) no se conocen.

En este trabajo diseñamos un sistema de mutagénesis que nos permite replicar la evolución que tiene que tener lugar en un TCS para conferir la capacidad para adaptarse a una nueva condición ambiental. El sistema de mutagénesis se basa en la RNA polimerasa del fago T7 fusionado a la citidina deaminasa y la cepa de *S. aureus* (Δ XV) que carece de todos los TCS. En la comunicación presentaremos los resultados que se han obtenido durante la evolución del TCS *virRS* de *Listeria monocytogenes* hasta adquirir la capacidad de conferir resistencia al antibiótico bacitracina en *S. aureus*.



Deciphering the post-transcriptional regulation of the General Stress Response in *Sphingopyxis granuli* TFA

Inmaculada García-Romero¹, Rubén de Dios² and Francisca Reyes-Ramírez¹

¹ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD/CSIC), Junta de Andalucía, Universidad Pablo de Olavide (UPO), Sevilla.

² Division of Biosciences, Department of Life Sciences, Centre of Inflammation Research and Translational Medicine, College of Health, Medicine and Life Sciences, Brunel University London, Uxbridge, UK

igarrom@upo.es

In natural habitats, microorganism face many adverse conditions, necessitating genetic adaptations for survival. A main mechanism for this adaptation is the modulation of gene expression through alternating sigma factors (σ -factor), which are small subunit of the RNA polymerase (RNAP) involved in promoter recognition by the core of the RNAP. Although some σ -factors respond to the presence of a specific stressor, bacteria have developed a General Stress Response (GSR) to activate a broad spectrum of genes to combat diverse adverse conditions. In Alphaproteobacteria, such as *Sphingopyxis granuli* strain TFA, the GSR involves three main cytoplasmic proteins: an extracytoplasmic function σ -factor (Ecf), an anti-sigma factor (NepR) and a response regulator or anti-anti-sigma factor (PhyR) [1].

TFA is an Alphaproteobacteria able to grow using the pollutant tetralin as a sole carbon and energy source, whose degradation pathway and regulation have been widely characterized [2]. Thus, TFA is the only facultative anaerobe within its genus [3]. Due to the interest of this bacterium in bioremediation, we are exploring the regulation of the GSR against a variety of environmental conditions. TFA genome contains duplicate copies of each GSR regulatory protein (EcfG1, EcfG2, NepR1, NepR2, PhyR1, and PhyR2) and four sensor histidine kinases (HK) candidates. The role of each protein in the regulatory cascade is well understood, except for the HKs. EcfG2 is the primary activator of the GSR, NepR1 repress the GSR in absent of stress, NepR2 has its main role in a late-on activation to avoid the overactivation of the GSR and PhyR1 and PhyR2 are specialized in activating the GSR in response to different stressors [4, 5].

In this work, we present ongoing investigations into the potential post-transcriptional regulation of the GSR cascade, which is another layer of regulation that remains unexplored in Alphaproteobacteria compared to other phylogenetic groups. We focus on the role of Hfq, an RNA chaperone involved in numerous cellular functions, including post-transcriptional gene expression regulation through RNA binding. We have performed Hfq::3xFLAG co-immunoprecipitation and RIL-seq analysis (RNA interaction by ligation and sequencing) to investigate the small RNAs (sRNA) and mRNAs that bind Hfq and may be involved in the stress response.

1. Fiebig, A., et al.,. Annu Rev Genet, 2015. **49**: p. 603-25.
2. Floriano, B., E. Santero, and F. Reyes-Ramírez,. Genes (Basel), 2019. **10**(5).
3. García-Romero, I., et al.,. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 93.
4. de Dios, R., et al.,. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 5177.
5. de Dios, R., E. Santero, and F. Reyes-Ramírez. Environ Microbiol, 2022. **24**(4): p. 1918-1931.

Acknowledgments: This work has been supported by the Grant PID2021-125491NB-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades / Agencia Estatal de Investigación), and by FEDER, EU to FR-R; and by the postdoctoral contract for IGR (PAIDI 2020, POSTDOC_21_00064) funded by Andalusian Government (Junta de Andalucía).



Adaptación de *S. aureus* a factores ambientales en ausencia de TCS.

Nahiara Garmendia, Begoña García, Maite Echeverz, Alvaro San Martín e Iñigo Lasa

Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain.

nahiara.garmendia@unavarra.es

Las bacterias utilizan los sistemas de dos componentes (TCS) para detectar señales ambientales y generar una respuesta que adecue la fisiología de la bacteria a dicha condición. La activación de un TCS es reversible, y si la señal desaparece, el sistema vuelve a la situación basal. En ausencia de TCS, las bacterias necesitan recurrir a mutaciones que adecuen la expresión de los genes a las señales ambientales, pero esta forma de adaptación es difícilmente reversible si las condiciones ambientales se reestablecen. En este trabajo hemos analizado experimentalmente las consecuencias que tiene para una bacteria la adaptación a factores ambientales cambiantes si no dispone de TCS. Para ello, hemos utilizado una cepa de *Staphylococcus aureus* a la que delecionamos 15 de los 16 TCS (*S. aureus* Δ XV) (1). *S. aureus* Δ XV es incapaz de crecer en altas concentraciones de sal, y dicho fenotipo se restaura completamente restaurando un único TCS (TCS1). En este trabajo hemos evolucionado la cepa *S. aureus* Δ XV y *S. aureus* Δ TCS1 hasta conseguir reestablecer su crecimiento en condiciones de alta sal (*S. aureus* Δ XV-evol y *S. aureus* Δ TCS1-evol). Hemos analizado los cambios que han experimentado en su genoma y comparado su perfil transcriptómico con el de la cepa *S. aureus* WT. Finalmente hemos comparado el crecimiento de la cepa *S. aureus* Δ XV-evol en condiciones de baja sal con el de la cepa *S. aureus* Δ XV, para determinar el coste de fitness que supone para la bacteria adaptarse a vivir en condiciones de alta sal sin disponer de TCS. Los resultados obtenidos serán discutidos en la presentación.

(1) Villanueva, M., García, B., Valle, J. et al. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* 9, 523 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02949-y>



DNA adenine methylation epigenetic control of the FNR transcriptional regulatory network in *Haemophilus influenzae*

Celia Gil-Campillo^{1,2}, Begoña Euba^{1,2}, Irene Rodríguez-Arce¹, David San León³, Javier Asensio-López^{1,2,4}, Nahikari López-López¹, Joshua C. Mell⁵, Gabriel Gutiérrez⁶, Jeroen D. Langereis⁷, María Antonia Sánchez-Romero⁸, Junkal Garmendia^{1,2}

¹Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC)-Gobierno de Navarra, Mutilva, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain; ³Department of Systems Biology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, Spain; Interdisciplinary Platform for Sustainable Plastics towards a Circular Economy-Spanish National Research Council (SusPlast-CSIC), Madrid, Spain; ⁴Asociación de la Industria Navarra (AIN)-Gobierno de Navarra, Cordovilla, Spain; ⁵Center for Molecular Parasitology, Institute for Molecular Medicine and Infectious Disease, Department of Microbiology and Immunology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, United States of America; ⁶Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Seville, Seville, Spain; ⁷Section Pediatric Infectious Diseases, Laboratory of Medical Immunology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences and Radboud Center for Infectious diseases, Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands; ⁸Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain.

celia.gil@csic.es

Haemophilus influenzae is a human-adapted pathogen causing recurrent airway infections in chronic respiratory patients. By using transposon insertion deep sequencing, we screened bacterial genes required for airway infection and identified the methyltransferase Dam as contributor to *in vivo* airway bacterial fitness. This observation suggested that expression of bacterial genes key to this host-pathogen interplay may undergo epigenetic regulation. To study the role of DNA adenine methylation in the regulation of *H. influenzae* gene expression, we followed two complementary approaches: (i) RNA sequencing to profile differential gene expression when comparing WT and *dam* mutant strains; (ii) methylome analysis to profile hypo/hemi-methylated GATC sites in non-coding regions.

Transcriptomic profiling showed that *dam* inactivation led to overexpression of the fumarate nitrate reductase (FNR) transcriptional regulator, next to the FNR-regulon belonging genes *ytfE*, *dmsA* and *cydD*. RNAseq under anaerobic growth confirmed *fnr* overexpression, also expanded to (i) the *dmsA*, *nrfA*, *napA*, *torZ* genes, involved in terminal reactions of *H. influenzae* anaerobic respiration and likely contributing to alleviate oxidative stress; (ii) *moa* genes involved in molybdenum cofactor biosynthesis; and (iii) the *htpG* heat shock protein encoding gene. Several of these proteins bind a functional [4Fe-4S] cluster thus requiring iron availability to be functional, and expression of the ferric uptake regulator (Fur) encoding gene was downregulated upon *dam* inactivation. Further analysis identified GATC motifs in the *fnr*, *dmsA*, *cydD*, *htpG*, *napA* and *nrfA* promoters; putative FNR binding sites in the *fnr*, *ytfE*, *dmsA*, *cydD*, *napA* and *nrfA* promoters; putative Fur binding sites in the *ytfE*, *cydD*, *dmsA*, *htpG* and *fnr* promoters. Methylation of the GATC sites was confirmed, and insights on this methylation-FNR-Fur regulatory network deciphered.

Methylome analysis showed GATC hypo/hemi-methylation in an intergenic region containing two GATC motifs, and comprising the *htpG* promoter. *htpG* gene expression was heterogeneous, suggesting phenotypic heterogeneity regulated by Dam methylation, which was further distanced by single-cell analyses.

This study highlights epigenetic control of the FNR transcriptional regulatory network in *H. influenzae*, connected to oxygen and iron availability, and shows the first case of phenotypic heterogeneity driven by methylation in this respiratory pathobiont.

Funding: C.G.-C. is funded by a PhD student ship from Programa de Formación de Personal Investigador (FPI), PRE2019-088382. This work has been funded by grants MICIU RTI2018-096369-B-I00 and PID2021-125947OB-I00 to J.G. CIBER is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.



Conjugación a microorganismos Gram positivos de interés sanitario e industrial como punto de partida para su modificación genética.

Pablo Guridi-Fernández, Dolores Lucia Guzmán-Herrador, Andrea Fernández-Gómez, Rafael Falla-Fernández, Silvia Calero, Matxalen Llosa.

Universidad de Cantabria (Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria)

guridip@unican.es, matxalen.llosa@unican.es

La conjugación bacteriana consiste en la transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, permitiendo la diseminación de fenotipos como la resistencia a antibióticos. La información se transmite habitualmente en plásmidos que codifican al menos un *oriT* para su transferencia conjugativa. Hay diversos trabajos que muestran la posibilidad de enviar por conjugación ADN desde *Escherichia coli* a bacterias Gram-positivas, lo que facilita la manipulación del ADN en *E. coli* y el acceso a ciertas estirpes bacterianas de difícil manipulación. Por tanto, la conjugación es una potencial puerta de entrada a modificaciones de interés en bacterias Gram positivas relevantes en el ámbito sanitario, ambiental o industrial.

En el presente trabajo sintetizamos los resultados de conjugación de *E. coli* a bacterias Gram positivas realizados en nuestro laboratorio. Además de cepas de laboratorio, nos hemos centrado en bacterias silvestres cuya modificación puede ser ventajosa frente a la expresión heteróloga en organismos modelo. Hemos utilizado los sistemas conjugativos de amplio rango de huésped de los plásmidos RP4 y R388 para movilizar plásmidos conteniendo sus *oriTs*, así como para movilizar al plásmido RSF1010. De estos tres sistemas, nos interesa tanto su probada promiscuidad, como su relaxasa conjugativa, que utilizamos para fusionar y translocar proteínas de interés a la célula receptora. Tanto TrwC (R388) como MobA (RSF1010) son idóneas para ese propósito.

Adaptando los protocolos de conjugación a cada bacteria receptora, hemos conseguido conjugar por primera vez a varios géneros de lactobacilos, incluyendo especies recalcitrantes a la transformación de interés industrial. También hemos conseguido obtener transconjugantes en aislados silvestres de piel humana de *Staphylococcus epidermidis*, patógeno oportunista con potencial interés para uso tópico en humanos, así como cepas silvestres con capacidad probiótica, como *Bifidobacterium longum* var. *longum* CECT 7347. Actualmente estamos optimizando la conjugación al género *Streptomyces*, un microorganismo de alto interés industrial por su rico metabolismo secundario. Hemos puesto a punto un sistema de conjugación a *S.lividans* y *S.coelicolor* empleando derivados del plásmido RSF1010, algo no descrito hasta ahora. Esperamos poder combinar este protocolo con nuestras herramientas de transferencia de ADN y proteínas a cepas silvestres de interés biotecnológico.



Microscopía de célula viva para estudios MICROSCOPIA DE CÉLULA VIVA PARA ESTUDIOS FUNCIONALES DE LARGA DURACIÓN EN CIANOBACTERIAS

Raquel Gutiérrez-Lanza¹, Víctor Campa¹, Alfonso Mendaña¹, Marina Domínguez-Quintero¹, Carlos Díaz-Ceballos¹, María Santos-Merino², Alicia Muro-Pastor³ and Raúl Fernandez-Lopez¹

1. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Santander. Spain

2. Michigan State University, East Lansing, USA

3. Instituto de Bioquímica vegetal y Fotosíntesis. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sevilla. Spain

raquel.gutierrezlanza@unican.es

Los marcadores de fluorescencia, utilizados en conjunto con la microscopía de célula viva, proporcionan información clave sobre la dinámica de la expresión génica y la función proteica. En cianobacterias, las lentas tasas de crecimiento combinadas con sus particulares requisitos de iluminación, plantean retos específicos para la aplicación de estas técnicas. En este trabajo hemos desarrollado protocolos estandarizados que permiten el seguimiento continuo de microcolonias de cianobacterias durante >96 h bajo el microscopio y su crecimiento óptimo. Para lograr esto se utilizaron sensores con medidores de potencia, calibrando la iluminación del microscopio a intensidades de luz específicas. Gracias a estos protocolos, se pudieron monitorizar la formación de heterocistos en *Anabaena* y la expresión génica circadiana en *Synechococcus elongatus*, mostrando así la versatilidad de estos métodos para descifrar la dinámica molecular de las cianobacterias.



**"El potencial de la conjugación bacteriana en la edición genética de estirpes silvestres.
Envío de sistemas CRISPR-Cas por medio de relaxasas"**

Dolores L. Guzmán-Herrador¹, Andrea Fernández-Gómez¹, Pablo Guridi-Fernández¹, Silvia Calero¹, David Bikard², Matxalen Llosa^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria (UC), Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), UC – CSIC – SODERCAN, Santander, España. ²Instituto Pasteur, Paris, Francia

mllosa@unican.es

La conjugación bacteriana es un mecanismo de transferencia genética horizontal entre dos bacterias que tienen que estar en contacto físico. Es un proceso promiscuo que permite el envío de ADN a gran variedad de bacterias receptoras. En nuestro laboratorio hemos establecido protocolos de conjugación para introducir ADN en bacterias de interés biotecnológico pero recalcitrantes a la transformación, mejorando o permitiendo su manipulación genética. Hemos conseguido introducir plásmidos a distintas estirpes de lactobacilos, bifidobacterias, estafilococos y estreptomicetos, incluidas estirpes silvestres de gran interés biotecnológico.

Durante la conjugación, una proteína, la relaxasa, se encarga del procesamiento del ADN a movilizar y es reconocida y translocada a través del sistema de secreción tipo IV (SST4) a la célula receptora, donde es activa. Aprovechando este hecho, proponemos su uso como vehículo para enviar péptidos fusionados a la misma durante la conjugación bacteriana. Partiendo de esta premisa, hemos sido capaces de enviar *in vivo* a una bacteria receptora la nucleasa Cas12a fusionada a la relaxasa TrwC. Hemos demostrado que la fusión es activa en la célula receptora, y además hemos enviado covalentemente unida a esta proteína de fusión una molécula de ADN que codifica el ARN guía o un molde para la recombinación homóloga. De este modo, podemos enviar sistemas CRISPR-Cas *in vivo* sin necesidad de expresar la nucleasa en la célula diana.

Para demostrar la versatilidad de estos sistemas, hemos generado otras herramientas fusionando distintas relaxasas a un editor de bases. De nuevo, hemos demostrado su actividad en la célula receptora tras translocar la proteína de fusión a través del SST4. Hemos editado de forma específica dianas plasmídicas y cromosómicas. Además, hemos enviado ADN que codifica el ARN guía covalentemente unido a la proteína de fusión, de modo que se puede abordar la edición de cualquier bacteria silvestre receptora de conjugación.

Estos resultados muestran la versatilidad de la conjugación bacteriana para enviar herramientas de modificación genética, abriendo una nueva puerta a la modificación de bacterias de difícil manipulación.



Identification of pervasive plasmid-chromosome interactions to combat antibiotic resistance

Cristina Herencias, Ignacio de Quinto, Laura Jaraba-Soto, Laura Álvaro-Llorente, Álvaro San Millán, Jerónimo Rodríguez-Beltrán

Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas-CIBERINFEC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, Spain. Centro de Investigación Biológica en Red Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

cherodr@gmail.com

The rise and worldwide spread of antimicrobial resistance (AMR) represent a pressing challenge for worldwide public health in recent times. Bacterial pathogens propagate AMR genes primarily through horizontal gene transfer facilitated by mobile genetic elements accelerating the spread of AMR, and exacerbating the burden of drug resistance. Consequently, there is an urgent need to develop novel strategies aimed at controlling bacterial infections and mitigating the proliferation of AMR.

Plasmids serve as key elements in facilitating the horizontal transfer of AMR genes among bacteria. However, in non-selective conditions, acquiring plasmids often incurs a fitness cost. This cost manifests as a diminished growth rate and weakened competitive advantage of plasmid-bearing strains. Despite the paramount importance of plasmids for bacterial ecology and evolution, the molecular mechanisms underlying plasmid fitness costs remain incompletely understood.

In this study, we employed CRISPR interference (CRISPRi) screenings to elucidate these mechanisms. CRISPRi screens offer information on the fitness effects resulting from individually blocking the transcription of all genes within a genome one by one. By systematically targeting all genes within the *Escherichia coli* genome, we deciphered the molecular basis of the fitness costs induced by various AMR plasmids with unprecedented throughput and precision. Our results revealed multiple plasmid-specific responses, underscoring the extensive interplay between plasmid and chromosomal genes. Furthermore, we identified a conserved source of fitness costs across plasmids, implicating the cellular periplasmic stress response. These discoveries carry significant implications for plasmid evolution and suggest a common mechanism underlying plasmid fitness costs. Moreover, they reveal promising candidate genes that could be targeted in novel therapies to effectively combat the dissemination of AMR plasmids.



**Evolutionary approaches to tackle *Pseudomonas aeruginosa* infections:
transient and stable collateral sensitivity**

Sara Hernando-Amado¹, Pablo Laborda^{1,2,3}, José Luis Martínez¹

¹ Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. 28049-Madrid. Spain.

² The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark.

³ Department of Clinical Microbiology 9301, Rigshospitalet, Denmark.

shernando@cnb.csic.es

Collateral sensitivity (CS), a trade-off by which resistance to an antibiotic leads to susceptibility to another, has been traditionally linked to the acquisition of antibiotic resistance mutations. Despite the potential of CS, its clinical use depends on its conservation in different genetic backgrounds, since infections may be heterogeneous. This led us to look for robust patterns of CS in *Pseudomonas aeruginosa* using ALE assays on different antibiotics. Different ciprofloxacin resistance mutations were acquired in diverse antibiotic-resistant mutants and clinical isolates, always causing CS to tobramycin (1, 2); a case of phenotypic convergence in the absence of parallel evolution. Further, the combination ciprofloxacin-tobramycin was effective driving the analyzed strains to extinction. Interestingly, and although all ciprofloxacin resistance mutations led to CS to tobramycin, the strength of this phenotype was greater in mutants in *nfxB* (encoding the negative regulator of the MexCD-OprJ efflux pump). We hypothesized that it would be possible to induce a transient (non-inherited) state of CS to tobramycin by temporary inactivating NfxB, using the *mexCD-oprJ* inducer dequalinium chloride (3). This strategy allowed us to induce CS to tobramycin in different resistant mutants and clinical isolates, some of them originally resistant to tobramycin and including high-risk clones. Finally, using ALE assays, we showed that the combination tobramycin-dequalinium chloride is extremely effective driving varied isolates to extinction. Our data support that CS can be temporally induced, avoiding the selection of resistant mutants in which traditional CS depends, suggesting new opportunities for the design of strategies to treat infections using existing antibiotics.

- 1 Hernando-Amado, S., Laborda, P., Valverde, J. R. & Martinez, J. L. Mutational background influences *P. aeruginosa* ciprofloxacin resistance evolution but preserves collateral sensitivity robustness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **119**, e2109370119, doi:10.1073/pnas.2109370119 (2022).
- 2 Hernando-Amado, S. *et al.* Rapid Phenotypic Convergence towards Collateral Sensitivity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Presenting Different Genomic Backgrounds. *Microbiology spectrum*, e0227622, doi:10.1128/spectrum.02276-22 (2022).
- 3 Hernando-Amado, S., Laborda, P. & Martinez, J. L. Tackling antibiotic resistance by inducing transient and robust collateral sensitivity. *Nature communications* **14**, 1723, doi:10.1038/s41467-023-37357-4 (2023).



La “vida oculta” de los genes de resistencia: impacto de *ereA2* en la motilidad bacteriana.

Alberto Hipólito, Lucía García-Pastor, Ester Vergara, Laura Toribio-Celestino, Álvaro San Millán, José Antonio Escudero.

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, MBA lab.

alberhip@ucm.es

La resistencia a los antimicrobianos constituye una de las mayores amenazas para la salud global del siglo XXI¹. Los integrones móviles juegan un papel principal en esta crisis ya que son capaces de capturar, y vehicular más de 200 *cassettes* de resistencia (CR) frente a diversas familias de antibióticos²⁻⁴ entre los patógenos Gram negativos más importantes. Si bien el éxito de esta plataforma es considerable, la prevalencia de los CR que porta varía notablemente, incluso entre aquellos que confieren la misma resistencia. Esto indica que, más allá de su función principal, existen otras variables que determinan el éxito evolutivo de cada CR. Un caso especialmente interesante es el del *cassette ereA2* que confiere resistencia a eritromicina, antibiótico al que las bacterias Gram negativas son naturalmente resistentes. Mediante ensayos de competición bacteriana hemos cuantificado el coste asociado a este *cassette* en *E. coli*. *ereA2* muestra un impacto positivo en el *fitness* bacteriano en condiciones aerobias, pero un coste significativo en anaerobiosis, llevando a su rápida pérdida en el intestino usando un modelo murino. Hemos investigado las bases genéticas de este fenómeno, analizando el efecto de *ereA2* en la transcriptómica de *E. coli*. A través de RNA-seq, identificamos cambios en la regulación de 363 genes con diversas funciones, destacando una fuerte represión de operones regulados por Flh-DC, esenciales en la función flagelar en *E. coli*⁵. Experimentos de motilidad en *E. coli* confirmaron un defecto en la motilidad en presencia de *ereA2*, que se mantiene en otros entornos genéticos, como en aislados clínicos. Además, este defecto en motilidad se observa en mutantes catalíticamente inactivos de EreA2 lo que sugiere que es la proteína, y no su actividad enzimática, la responsable del fenotipo. Actualmente buscamos las proteínas con que EreA2 interactúa para comprender el mecanismo subyacente. EreA2 ejemplifica cómo los genes de resistencia pueden impactar en la fisiología de su hospedador a través de funciones secundarias relevantes en su ecología y dispersión. Este trabajo amplía las posibles estrategias basadas en la utilización de aspectos ecológicos y evolutivos contra la resistencia.

1. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
2. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The integron: Adaption on demand. *Microbiol. Spectr.* 25–32 (2014). doi:10.1128/microbiolspec
3. Hipólito, A. *et al.* The expression of aminoglycoside resistance genes in integron cassettes is not controlled by riboswitches. *Nucleic Acids Res.* **50**, 8566–8579 (2022).
4. Hipólito, A., García-Pastor, L., Vergara, E., Jové, T. & Escudero, J. A. Profile and resistance levels of 136 integron resistance genes. *npj Antimicrob. Resist.* **1**, 13 (2023).
5. Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P. & Wade, J. T. Comprehensive Mapping of the Escherichia coli Flagellar Regulatory Network. *PLoS Genet.* **10**, (2014).



Transposon Sequencing Reveals a Novel Sensory System Impacting *Streptococcus suis* Pathogenesis

[María Juanpere-Borras](#), Jos Boekhorst, Blanca Fernandez-Ciruelos, Peter van Baarlen and Jerry Wells.

Host-microbe Interactomics, Wageningen University

maría.juanpereborras@wur.nl

Streptococcus suis is a zoonotic agent capable of inducing sepsis and meningitis in both pigs and humans, causing substantial economic losses. Cross-protective vaccines are not available and antibiotics are commonly used to control the spread of *S. suis* on farms. This increases the development and spread of antimicrobial resistance drawing attention of the global health community [1]. Alternatives to the currently most often used antibiotics are crucial, requiring research on identifying new therapeutic targets. This is a challenging goal because a large proportion of *S. suis* genes and proteins only have predicted functions. A better understanding of the virulence factors required for survival and growth in the host environments during colonization and invasive disease would be valuable strategy to identify new therapeutic targets. Here, we present the construction of a highly saturated transposon library in *S. suis* P1/7 and high-throughput transposon sequencing screen (Tn-Seq) for fitness determinants in body fluids.

The mutant strain library was screened in porcine serum and cerebrospinal fluid extracted from choroid plexis organoids, representing early and late (meningitis-associated) stages of the infection, respectively. After growing the library, mutants were collected and sequenced using Nanopore technologies, achieving fast in-house, accurate results. The Tn-Seq data analysis pipeline was updated to incorporate nanopore reads for the identification of gene disruptions that are significantly affecting growth in these conditions.

We identified a nucleoside ABC transporter and a previously unknown sensory system involved in *S. suis* proliferation in serum. Subsequent characterization of this sensory system unveiled also its importance for biofilm formation. We elucidated the self-regulatory mechanisms of this sensory system and its connexion with the well-studied virulence and antibiotic resistance, three component system LiaFSR. Additionally literature indicates that this sensory system is widespread in gram-positive bacteria but remains largely unexplored. Our findings give insights on the complex regulatory network involved in *S. suis* pathogenesis, providing potential new therapeutic targets for combating *S. suis* infections.

[1] Dechêne-Tempier et al. (2021) *Microorganisms*. 18;9(8):1765.

This project has received funding from the EU Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement n° 956154.



Elucidating the components of the *Bacillus subtilis* SP β bacteriophage viral particle

Abida Bano¹, Aisling Brady^{2,3}, [Sandra Lahoz-Oliva](mailto:sandra.lahozoliva@uchceu.es)⁴, Laura Miguel-Romero⁵, Cora Chmielowska⁶, Francisca Gallego del Sol^{5,7}, Alberto Marina^{5,7}, José R Penadés⁶, Nuria Quiles-Puchalt⁴

Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad CEU Cardenal Herrera, CEU Universities, Valencia, Spain.

¹ MRC Centre for Bacterial Resistance Biology, Imperial College London, London, United Kingdom

² Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

³ Institute of Infection, Veterinary and Ecological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, UK

⁴ Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad CEU Cardenal Herrera, CEU Universities, Valencia, Spain.

⁵ Instituto de Biomedicina de Valencia, Valencia, Spain

⁶ MRC Centre for Bacterial Resistance Biology, Imperial College London, London, United Kingdom

⁷ CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)-ISCIII, 46010 Valencia, Spain

sandra.lahozoliva@uchceu.es

Bacteriophages, or phages, are naturally occurring viruses that infect a diverse range of bacterial hosts, showcasing variations in lifestyles, genetic content, and viral particle components. The SPBeta family of bacteriophages specifically targets *Bacillus subtilis*. Classified as temperate phages within the Siphoviridae family of double-stranded DNA viruses, phage SP β serves as a model for this family and was initially identified in the *Bacillus subtilis* strain 168. Its genome comprises 138,418 base pairs, encoding 188 open reading frames (ORFs). Recently, the SPBeta phages have garnered attention due they encode a quorum sensing system that regulates the decision-making process in the phage life cycle. In this study, we conducted a comprehensive examination of this intriguing phage, focusing on a systematic search for proteins involved in the production of infective viral particles. Utilising mass spectrometry analysis, we performed a proteomic characterisation of the viral particle, identifying 7 proteins within its proteinaceous structure. Upon identifying the genetic locus responsible for packaging-related genes, we further characterised 4 additional proteins crucial for the packaging process of the phage. Additionally, we successfully pinpointed the receptor protein that the phage recognises during infection of *Bacillus* cells. This research represents the first-time characterisation of novel proteins involved in the packaging process of the SPBeta family of phages.

The research presented in this abstract was made possible through funding provided by Proyecto PID2022-142928NA-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by FEDER, UE. Additionally, we were funded by “Ayuda para la formación de jóvenes investigadores Santander-CEU”.



(IN)Stability of Synthetic-Replicative plasmids in cyanobacteria

Rocío López-Igual^a, Alicia Segura-Mejías^a, Daniel Neyra^a, Rafael Salas-Aparicio^a and Ignacio Luque^a.

^aInstituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC and Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

rocio.lopez@ibvf.csic.es

Cyanobacteria are photosynthetic bacteria that have long been considered interesting organisms for biotechnological purposes. However, the repertoire of genetic tools for genome engineering in cyanobacteria is underdeveloped compared to that of heterotrophic bacteria. More specifically, the lack of genetic tools such as synthetic-replicative (SR) plasmids for cyanobacteria is a limitation to progress in this field.

We have developed a modular system for plasmid construction inspired by a previous approach (1). We worked in two cyanobacterial model strains: the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 and the unicellular *Synechocystis* sp. PCC 6803. The combinations of parts yielded 30 plasmids that contained a replication module, antibiotic resistance cassettes, and a *gfp* reporter under a constitutive promoter that was used to monitor their fate by fluorescence. *Anabaena* containing plasmids integrated into the chromosome showed a homogeneous GFP signal along the filaments. However, strains containing SR-plasmids showed a noisy distribution of GFP in cells along the filament, which may indicate an uneven plasmid copy number (PCN). The SR-plasmids were based on two different replicons: pDU1 and RSF1010, with variants of the two. The RSF1010 plasmids also showed heterogeneity in the unicellular strain *Synechocystis*. Compiling our results, we can infer that the stability of SR-plasmids depends on both the origin of replication and the resistance cassette. Furthermore, we construct single plasmids carrying multiple resistance cassettes that can be selected using different antibiotics. Interestingly, these plasmids showed an uneven distribution depending on the antibiotic used for selection in the two cyanobacterial strains.

Currently, we are investigating the causes of noise, which may be due to the unequal PCN of SR-plasmids. We are aiming not only to deal with the heterogeneity of the populations, but also to create precise systems (based on SR-plasmids) to advance genetic manipulation of cyanobacteria. Our study represents an unprecedented approach to these mobile genetic elements with potential applications in genetic engineering in this group of photosynthetic bacteria.

(1) Taton, A., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gku673.

Funding:

- Grant PID2019-104784RJ-I00 MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spain.
- Grant RYC2021-034768-I funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and the EU "NextGenerationEU"/PRTR".
- Programa Operativo de Empleo Juvenil (marco del Fondo Social Europeo, FSE), Universidad de Sevilla (Reference: EJ5-62) to ASM.
- VI Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla, 2020.
- VII Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla, 2023. Ref: VIIPPIT-2023-II.2. y Atracción Investigadores Alto Potencial. Ref: VIIPPIT-2022-II.5.
- AYUDAS A LOS AGENTES NO UNIVERSITARIOS DEL SISTEMA ANDALUZ DEL CONOCIMIENTO PARA LA CONTRATACIÓN DE JÓVENES INVESTIGADORES Y PERSONAL TÉCNICO DE APOYO DE I+D+I, (BOJA núm. 138, de 20 de julio de 2021) (Reference AND21_IBVF_M2_087) to DN.



New genetic tools for the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Carmen Pérez-Nieto, Juan E. Pérez-Fernández, Pablo Sousa, Luis G. Heredia, Encarnación Díaz-Santos, Manuel Hervás, José M Ortega, Mercedes Roncel, Jose A Navarro, Luis López-Maury

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC

llopez1@us.es

Cyanobacteria, the evolutionary precursors of chloroplast, are the simplest organisms able to perform oxygenic photosynthesis, constituting a very diverse group of eubacteria that can be found in a wide variety of habitats. Consequently, these organisms make a key contribution to global primary production, especially in the oceans. In addition, cyanobacteria are able to fix CO₂ to yield products with industrial and pharmaceutical uses (antibiotics, pigments, antioxidant agents, biomedical, biodiesel, etc.) and have biotechnological applications in bioremediation processes. These makes cyanobacteria promising bio-factories, since they combine capture and elimination of CO₂ with bioproduction, in an environmentally friendly way. Although cyanobacteria are easily genetically manipulated in comparison to other heterotrophic microorganisms, their genetic tools are still scarce and underdeveloped. We are currently implementing new genetic tools in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: 1. We have generated a barcoded transposon library to identify essential genes and that will allow us to sample the genetic landscape in this organism. 2. We are implementing and optimizing the use of a compact CRISPR system based on Cas12f. 3. We have developed regulated expression system in both integrative and replicative vectors. 4. We are investigating the use of alternative replicative plasmids to those based in RSF1010, that are the most successful plasmids used in cyanobacteria, using the SEVA plasmid collection.

Grants PID2020-112645GB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and TED2021-129165B-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “European Union NextGenerationEU/PRTR”



***Saccharomyces cerevisiae* como plataforma de estudio de la ruta de inmunidad innata humana cGAS-STING-TBK1**

Sara López-Montesino, María Molina y Víctor J. Cid

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS). Universidad Complutense de Madrid, España.

saralo08@ucm.es

La sintasa GMP-AMP cíclica (cGAS) es un receptor de ADN citosólico asociado a una infección viral o a un daño celular. Cuando detecta el ADN, cGAS dimeriza y genera un dinucleótido cíclico, cGAMP, que actúa como segundo mensajero uniéndose al efector STING, que a su vez activa a la quinasa TBK1, la cual es necesaria para los subsiguientes eventos de señalización que finalizan con secreción de interferón y otros mediadores proinflamatorios.

En el presente trabajo se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para estudiar: (i) la localización subcelular del receptor cGAS y de sus diferentes dominios, (ii) la localización subcelular de TBK1 y STING, así como de dos variantes de este último asociadas a la vasculopatía SAVI (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy*), V155M y V155R, y (iii) la fosforilación de STING y sus variantes por TBK1.

cGAS, STING y TBK1 se expresaron bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1* fusionadas a proteínas fluorescentes. Para comprobar la fosforilación de TBK1 y STING, se realizaron *immunoblots* con anticuerpos específicos. Como controles se utilizaron tanto mutantes no fosforilables de STING (S366A) y TBK1 (S172A) como versiones catalíticamente inactivas (TBK1 K38A).

En las células de levadura, cGAS-GFP co-localizó en forma de agregados citosólicos con Mdm34, un componente del complejo ERMES que sirve como contacto entre la mitocondria y el retículo endoplasmático. La localización de sus versiones truncadas demostró que el dominio C-terminal es necesario para formar los agregados citosólicos mientras que el dominio N-terminal previene la localización de cGAS en el núcleo. La producción de TBK1 es tóxica para la levadura de manera dependiente de su actividad quinasa y la autoactivación por fosforilación es necesaria para su actividad. Tanto STING como sus versiones mutantes co-localizan con TBK1 en el retículo endoplasmático y son fosforiladas por ésta independientemente de la presencia de cGAS.

La reproducción de aspectos fundamentales de esta importante ruta de señalización en el modelo de levadura revela una herramienta útil para su estudio a nivel molecular.

Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos PID2019-105342GB-I00, PID2022-138591NB-I00 y la beca FPI PRE2020-093244, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.



Amyloidogenicity and cytotoxicity of Rep-WH1 domains from plasmids in *X. fastidiosa*

Lucero-López, L., and Giraldo, R

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). C/ Darwin, 3. Cantoblanco (Madrid), 28049.

llucero@cnb.csic.es

In our group we had thoroughly characterized RepA, a protein involved in the DNA replication from a plasmid in *Pseudomonas savastanoi* [1]. This allowed us to prove that its WH1 dimerization domain assembles as a functional amyloid [2]. Furthermore, we were able to trigger the formation of RepA-WH1 amyloid aggregates in *Escherichia coli* [3], which turned out to be cytotoxic by forming pores in the bacterial lipid membrane, thus hampering the proton motive force and impeding membrane trafficking, reducing ATP synthesis and triggering the generation of ROS [2,4].

In this work we use the homologous Rep-WH1 domains from plasmids belonging to *Xylella fastidiosa* (*spp. pauca* and *spp. fastidiosa*) in order to trigger an amyloid proteinopathy in bacteria. Once independently expressed in *E. coli*, different types of toxic intracellular aggregates were formed, depending on the variant expressed. Besides, two different aberrant bacterial morphologies were acquired (cocci in the case of *spp. pauca* or filamentous in the case of *spp. fastidiosa*), and according to viability assays, different toxicity levels were achieved depending on the variant expressed. We also verified their amyloidogenicity by means of Th-S staining. In parallel, these were also expressed in *X. fastidiosa spp. fastidiosa*; a decrease in the viability was also obtained with both variants correlating with Rep-WH1 intracellular aggregation. We are now exploring through proteomics possible pathways for RepA-WH1 toxicity. Our final aim is to characterize the aggregation dynamics of both variants *in vitro* and explore their use as control agents against *X. fastidiosa in planta*.

[1] Giraldo R, Fernández-Tresguerres ME. *Plasmid*. (2004) 52:69-83.

[2] Molina-García L, et al. *Front. Microbiol.* (2017) 539:1-21.

[3] Fernández-Tresguerres ME, et al. *Mol. Microbiol.* (2010) 77:1456-6.

[4] Giraldo R. *mSystems* (2020) 5: e00553-20.



A novel zinc acquisition system that evolved in ancient bacteria

Cristina Sarasa-Buisan¹, Jesús A. G. Ochoa de Alda², Cristina Velázquez-Suárez³, Miguel Ángel Rubio³, Guadalupe Gómez-Baena⁴, María F. Fillat¹ and Ignacio Luque³
¹Universidad de Zaragoza; ²Universidad de Extremadura, ³CSIC y Univ. Sevilla; ⁴Universidad de Córdoba.

ignacio.luque@ibvf.csic.es

Zinc is a widespread cofactor that plays structural, catalytic, or regulatory roles in many proteins. This metal is essential for all organisms and must be acquired from the environment. In many bacteria, the acquisition and utilization of zinc are controlled by a master regulator named Zur, which belongs to the FUR family. Zur mainly acts as a repressor, although in some bacteria, it has been shown to activate a subset of genes. We analyzed the exoproteome of a *zur* mutant of the cyanobacterium *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120, and by comparison to the exoproteome of the wild-type strain, we identified exoproteins that are particularly enriched or depleted in the mutant. One such protein, named ZepA, is encoded by a gene repressed by Zur and is highly expressed under zinc scarcity conditions. ZepA is secreted, involving processing at both ends, and accumulates in the extracellular space. We obtained evidence showing that ZepA binds extracellular zinc and mediates transport of this metal into the cell by a mechanism that remains unknown, likely involving its interaction with a specific receptor on the cell surface. Based on mathematical models developed for siderophores, we propose that ZepA is more efficient for zinc acquisition when the host dwells in structured environments like microbial mats, biofilms, or soil, where the diffusion of the protein away from the producing cell is limited. ZepA homologs are only present in a handful of bacterial species from distant phyla, including Cyanobacteria, Proteobacteria, Nitrospirata, and the PVC superphylum. All homologs show a high degree of sequence similarity and conserved functional motifs. Phylogenetic analysis has shown that ZepA arose early in evolution, probably being present in the last bacterial common ancestor. The presence of ZepA in ancient bacteria is consistent with the scarcity of zinc in ecosystems of the Archean eon prior to the Great Oxygenation Event that occurred approximately 2.6 billion years ago.

Funding

Grant PID2019-104889GB-I00, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; grant E35_20R Biología Estructural, Gobierno de Aragón; grant PID2021-128477NB-I00, Ministerio de Ciencia e Innovación and FEDER



**Engineering β -solenoid modules: a monomeric LytA autolysin
from *Streptococcus pneumoniae***

Patricia de Obesso-Cintas¹; Jesús M. Sanz^{1,2,*}; [Beatriz Maestro](mailto:beatriz.maestro@ucm.es)^{3,*}

¹ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 28040 Madrid, Spain.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud

Carlos III, 28029 Madrid, Spain

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

* Equal contributors

beatriz.maestro@ucm.es

The LytA amidase from *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is the major autolysin of this gram-positive pathogen. This cell wall hydrolase is involved in the autolysis of this bacterium either at the end of the stationary phase of growth or in response to beta-lactamic antibiotics. The protein contains an N-terminal, catalytic module, and a C-terminal or choline-binding module (CBM), a polypeptide with a β -solenoid fold which is responsible of the attachment of the enzyme to the cell wall through the recognition of choline residues in the teichoic and lipoteichoic acids. LytA is one of the more than 15 members of the pneumococcal choline-binding protein (CBP) family, all of them sharing the presence of a CBM. However, LytA is the only host-encoded CBP that forms dimers through its CBM in response to choline binding, and the only CBP that is secreted without a conventional signal peptide as well. Although this dimeric configuration has been deemed as necessary to acquire the correct topology to attack the peptidoglycan network, this has not been demonstrated and dimerization might also play a particular structural role.

Here we have engineered a monomeric variant of LytA by replacing the C-terminal dimerization hairpin of the protein by the C-terminal loop of the monomeric CbpD hydrolase. This results in a monomeric variant with a decreased stability and affinity for choline, although its hydrolytic activities on cell wall preparations *in vitro* and on LytA-deficient pneumococcal cells in curation experiments *in vivo* are both comparable to those of the wild-type species.

Conclusions: Dimerization is an unusual feature of β -solenoid proteins which has only been observed in the LytA amidase as well as in a few phage-encoded endolysins. Despite this, dimerization is not necessary for the hydrolytic activity of LytA, but suggests instead that this biophysical event might be related to intracellular stability and/or translocation through the membrane without a signal peptide. Moreover, the results pave the way for the design of more stable β -solenoid polypeptides through the engineering of their oligomeric state.

Funding: Grants PID2022-139209OB-C21 and PID2022-139209OB-C22 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033.



Antimicrobial resistance analysis of *Listeria* spp. reveals non-pathogenic *Listeria* spp. as a reservoir of transposable elements with tetracycline resistance

Yuval Markovich^{a,c}, Carla Palacios-Gorba^{a,c}, Jesús Gomis Almendro^{b,c}, Ángel Gómez-Martín^{b,c}, Susana Ortolá^d, M.A. Yáñez^e, Juan J. Quereda^{a,c*}

^a*Listeria*: Biology and infection Research group

^bMicrobiological Agents Associated with Animal Reproduction (ProVaginBIO) Research Group

^cDepartamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain

^dPublic Health Laboratory of Valencia, 21, Avenida Catalunya, 46020 Valencia, Spain.

^eDepartamento de innovación, Labaqua, S.A.Pol. Ind. Atalayas c) Del Dracma 16-18 03114, Alicante, Spain.

yuval.markovich@uchceu.es, juan.quereda@uchceu.es

L. monocytogenes (*Lm*) is an important foodborne pathogen that can cause human and animal listeriosis. This severe systemic infection manifests as septicemia, neurolisteriosis, and maternal-foetal infection (1). Despite its innate resistance to certain antimicrobials, acquired antimicrobial resistance (AMR) in *Lm* is rare (2,3). AMR has been studied frequently in *Lm* considering the potential health consequences, however, it is much less surveyed in non-pathogenic *Listeria* spp. Here, we firstly analyzed AMR among *Lm* ($n=137$) and non-pathogenic *Listeria* spp. ($n=114$), including *L. innocua* (*Li*) ($n=89$). Phenotypic characterization was determined by disc diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods against a panel of 25 antibiotics and 4 antibiotics, respectively. Whole genome sequencing data was used for genotypic AMR characterization. Transposable elements were identified and determined among tetracycline-resistant strains using BLAST and BIGSdb-*Listeria*. Our results showed that 3 *Lm* isolates (2.2%, 3/137) acquired AMR genes (2 *ermG* for erythromycin, 1 *aphA* for aminoglycosides) and were detected in farm-related isolates. A higher prevalence of acquired AMR genes was detected among non-pathogenic *Listeria* spp. (9.6%, 11/114) than in pathogenic *Lm* (2.2%). Based on these findings, we analyzed a larger and an independent collection of 282 strains of *Li*. Altogether, acquired AMR genes were detected in 8.1% (30/371) *Li* isolates, conferring resistance mostly for tetracycline. Four different tetracycline resistance elements were detected, i.e., the *tet(M)* elements Tn5801.UAM (43.3%, 13/30), Tn5801.551 (26.7%, 8/30), and Tn916 (23.3%, 7/30), and the *tet(S)* Tn6000.205 (3.3%, 1/30). These results are in concordance with a recent report showing a higher prevalence of tetracycline resistance elements among *Li* (32%, 17/53) than in *Lm* (5.7%, 6/105) derived from wild black bears (4).

Since the gut is considered a key site for acquisition of AMR genes between species of *Listeria* via plasmids and transposons (5), the high prevalence of *Li* in domestic ruminant faeces (6) is of concern as a possible site for AMR genes exchange. The high prevalence of AMR *Li* isolates (8.1%) and detection of various tetracycline resistance elements in this study may suggest that non-pathogenic *Listeria* spp. may play a role as reservoirs of AMR mobile genetic determinants.

References

- (1) Disson O, Moura A, Lecuit M. Trends Microbiol. (2021).
- (2) Luque-Sastre L *et al.* Microbiol Spectr. (2018).
- (3) Moura A *et al.* Lancet Reg Health Eur. (2023).
- (4) Brown P *et al.* Appl Environ Microbiol. (2023).
- (5) Charpentier E, Courvalin P. Antimicrob Agents Chemother. (1999).
- (6) Palacios-Gorba C *et al.* Environ Microbiol. (2021).

Acknowledgments

We thank the WHO-Collaborating Centre and National Reference Centre for *Listeria* (Institut Pasteur, Paris) for sequencing and typing the isolates and SUEZ SPAIN, S.L.U.

This work was supported by Generalitat Valenciana (AICO/2021/278) (J.J.Q), Grant PID2022-137961OB-I00 (J.J.Q) funded by MICIU/AEI/ 10.13039/501100011033/ERDF/EU, Grant RYC-2018-024985-I (J.J.Q) and RYC2021-032245-I (A.G.M) funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 by ESF Investing in your future, and Universidad CEU Cardenal Herrera Programa INDI 22/44 (J.J.Q). Yuval Markovich is supported by a Predoctoral contract from the Universidad Cardenal Herrera-CEU.



***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv is a mutator due to a single SNP in the Noncanonical Mismatch Repair Protein NucS**

Isabel Martín-Blecua¹, Sonia Gullón Blanco¹, Esmeralda Cebrián-Sastre¹, Rafael Prados-Rosales², Alfredo Castañeda-García³, Jesús Blázquez^{1*}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología CNB-CSIC, Madrid, Spain

²Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

³Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIII), Majadahonda (Madrid), Spain

imartin@cnb.csic.es

NucS, the main protein of the non-canonical mismatch repair system is key to avoid the acquisition of point mutations in *Mycobacteria*. The role of NucS as a guardian of the genome is well-established in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium abscessus*, however, it had not been studied in *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis disease in humans. *M. tuberculosis* H37Rv, the main reference strain for the study of tuberculosis, presents a naturally-occurring non-synonymous polymorphism (SNP) in NucS at position 144, which changes the protein sequence from an arginine to a serine (R144S). This SNP is specific to H37Rv, while the consensus sequence for NucS in *M. tuberculosis*, including reference strains such as *M. tuberculosis* CDC1551, is NucS R144 (NucS_{REF}). To inquire about the role of NucS and the relevance of the R144S mutation in drug resistance acquisition by mutation, NucS_{REF}, its S144 variant (NucS_{S144}) and a deletion mutant of NucS (Δ nucS), were generated in *M. tuberculosis* H37Rv and CDC1551 strains. Rifampicin is the front-line drug used in the treatment of tuberculosis, therefore, we analyzed the rifampicin resistance mutation rate of the strains. The H37Rv strain, which naturally carries NucS_{S144}, showed a 2.4-fold increase in rifampicin resistance mutation rate as compared to the CDC1551 strain, which naturally carries NucS_{REF}. Generating the NucS_{S144} variant in CDC1551 led to a 3-fold increase in rifampicin resistance mutation rate in comparison to CDC1551 carrying NucS_{REF}. Furthermore, reversion of the H37Rv NucS SNP brought the rifampicin resistance mutation rate down to the same levels observed for the CDC1551 strain. The H37Rv Δ nucS strain had a 2-fold increase in rifampicin resistance mutation rate in comparison to H37Rv carrying NucS_{S144}, however, it had a 7-fold increase compared to H37Rv carrying NucS_{REF}. Taken together, this data suggests that NucS_{S144} is a defective variant of NucS that is responsible for the increased acquisition of rifampicin resistance in the *M. tuberculosis* H37Rv reference strain. This is the first breakthrough that reveals the role of NucS in *M. tuberculosis*, having potential implications for the treatment, but also for the study of *M. tuberculosis* H37Rv in laboratory conditions.

Financiación:

Estos resultados y contrato predoctoral son parte de la ayuda PRE2021-099108, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por el FSE+.

Proyecto PID2020-112865RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 de la Agencia Estatal de Investigación.

Agradecimientos:

Dr. Álvaro Chiner Oms de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) por la asistencia bioinformática. Dr. Kenan C. Murphy, Dr. Kadamba Papavinasasundaram and Dr. Christopher M. Sasseti de la University of Massachusetts Medical School por los plásmidos utilizados para la tecnología ORBIT y *oligo-mediated recombineering*.



Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Spain involve rare and complex resistance plasmids and ST lineages.

Sandra Martínez-Álvarez¹, Pierre Châtre², Pauline François², Myriam Zarazaga¹, Jean-Yves Madec², Marisa Haenni², Carmen Torres¹

¹Area of Biochemistry and Molecular Biology, One Health-UR Research Group, University of La Rioja - Logroño (Spain)

²ANSES – Université de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes - Lyon (France)

sandra.martinezal@unirioja.es

Introduction: Animal food products are important sources of zoonotic agents, increasing the risk of exposure to antibiotic-resistant bacteria (AMR) from farm to fork. Therefore, we aimed to detect ESBL-producing *E. coli* (Ec) from the poultry sector and to fully characterise them as well as the genetic determinants carrying resistance genes with a One Health approach.

Methods: From December 2021/to March 2022, 48 chicken meat samples (thigh/breast/minced meat) were collected from 16 establishments (nine local shops and seven supermarkets) in La Rioja (Northern Spain). Both selective (MacConkey) and enriched selective media (cefotaxime, 2 µg/mL) were used. Identification was confirmed by MALDI-TOF. Antibiotic susceptibility testing was assessed by the disk-diffusion method (CLSI, 2023). Long-read (Oxford Nanopore) and short-read (Illumina) WGS were performed on all ESBL-Ec isolates.

Results: Fifty-seven Ec isolates (1-2 isolates per sample) were recovered from 33 out of 48 chicken meat samples tested (68.8%). In addition, six ESBL-Ec (10.5%) were obtained, which belonged to ST1140-E/*bla*_{CTX-M-32} (n=1), ST752-A/*bla*_{TEM-52} (n=1), ST117-B2/*bla*_{CTX-M-1}/*bla*_{SHV-12} (n=2), ST10-A/*bla*_{SHV-12} (n=1) and ST223-B1/*bla*_{SHV-12} (n=1). Phylogenetic analysis revealed that ST117-Ec (from different farms) differed by 135 allelic differences (ADs). Three IncI1-plasmids (pST3-CC3) were found carrying the *bla*_{SHV-12}/*bla*_{CTX-M-1}/*bla*_{CTX-M-32} genes in different genetic environments: i) IS26-*smc-glpR-bla*_{SHV-12}-IS26 and ii) *wbuC-bla*_{CTX-M-32}/*bla*_{CTX-M-1}-*ISEcp1*. The *bla*_{TEM-52} gene was in a P1-phage flanked by an IS4-mediated composite transposon. The IncHI2 plasmid harboured a *bla*_{SHV-12} gene flanked by an IS26-mediated composite transposon inserted in a Tn21-derived. This transposon also harboured a non-classical integron (*sul3*-associated), indicating the sequential acquisition of several AMR genes (aminoglycosides-chloramphenicol-sulfonamides) with an embedded Tn1721. To analyse the cross-sectoral relatedness of our ESBL-Ec, we mapped our six genomes with those framed within the “EU AMR monitoring in livestock and meat project” establishing links between 53-136 ADs with caecal contents of dairy cows, beef calves or broiler chickens’ genomes.

Conclusion: This study demonstrates that ESBL genes are widely disseminated in chicken meat in Spain due to the diversity of clones and genetic backgrounds. Nevertheless, the predominance of ST117 and the IncI1-*bla*_{CTX-M-1-32}/*bla*_{SHV-12} plasmids might indicate the presence of successful clones and plasmids adapted to the chicken host.



Study and analysis of class Ia ribonucleotide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*.

Ángela Martínez-Mateos ^(1,2), Alba Rubio-Canalejas ^(1,2), Eduard Torrents ^(1,2)

(1) Bacterial Infections and Antimicrobial Therapies Group, Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain.

(2) Secció de Microbiologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

amartinezm@ibecbarcelona.eu

Pseudomonas aeruginosa is a highly adaptable opportunistic pathogen, exhibiting both acquired and innate antibiotic resistance mechanisms. The identification of novel therapeutic strategies is essential due to its ability to survive in diverse environments. Ribonucleotide reductases (RNRs), essential enzymes responsible for dNTPs synthesis, have emerged as promising targets to combat *Pseudomonas aeruginosa* infections. Among these, the class Ia RNR, encoded by the *nrdAB* operon, is regulated by different factors, such as NrdR and AlgR. However, there are still certain gaps in our understanding of the regulatory network of the *nrdAB* operon.

Experimental and bioinformatic analysis have described a long 5'UTR (untranslated region) on the *nrdA* promoter, suggesting that the 5'UTR may play a crucial role in the *nrdAB* operon regulation. Experimental analysis indicated that the absence of the 5'UTR leads to increased *nrdAB* expression, in contrast to its regulatory effect on other genes, such as *rpoD* and *nrdJab*. The 5'UTR region can be involved in mRNA decay, so a transcriptional shut-off assay was performed, demonstrating that the presence of 5'UTR leads to a reduction in *nrdA* mRNA half-life. Bioinformatic analysis suggested that 5'UTR may contain a B₁₂ riboswitch or a small non-coding RNA (sRNA) that can be responsible for *nrdA* transcription regulation.

Further research is required to fully elucidate the intricate mechanisms involved in the transcriptional and post-transcriptional regulation of the *nrdAB* operon.

This study was partially supported by grants RTI2018-098573-B-I00 and PID2021-125801OB-100 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and "ERDF A way of making Europe", the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2017SGR-1079), the European Regional Development Fund (FEDER), Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social "La Caixa". A.M-M. is thankful to Generalitat de Catalunya, for its financial support through FI (2022 FI_B 00313).



Estudio de los genes terminales fermentativos formadores de alcoholes y ácidos grasos de cadena corta presentes en la microbiota intestinal en la esteatosis hepática metabólica

Juan Manuel Medina-Méndez¹, Paula Iruzubieta², Raúl Fernández-López¹, Javier Crespo², Fernando de la Cruz¹

¹ Grupo de Intergenómica, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC). Santander. España.

² Servicio de Gastroenterología y Hepatología. Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Enfermedades Digestivas. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

medinajm@unican.es

Cambios en la composición de la microbiota intestinal (MI) se han asociado con la esteatosis hepática metabólica (EHmet). Sin embargo, estos cambios son muy variables entre estudios, probablemente debido a que los cambios taxonómicos no siempre conllevan cambios funcionales de la MI. Recientemente, se ha sugerido un posible papel de los alcoholes y ácidos grasos de cadena corta (ACC y AGCC, respectivamente) producidos por la MI en el desarrollo de esta patología. El objetivo de este estudio fue correlacionar la abundancia de genes de la MI involucrados en la síntesis de estos metabolitos con el estadio de fibrosis de EHmet en pacientes de tres cohortes independientes con esta patología.

Para ello se analizaron los perfiles metagenómicos obtenidos a partir del microbioma fecal de tres cohortes independientes de pacientes con diferentes estadios de EHmet. La primera cohorte está constituida por 73 pacientes europeos obesos con EHmet inicial (F0-F2) y diferentes grados de esteatosis hepática: 55 con esteatosis baja (grados 0-2) y 18 con esteatosis avanzada (grado 3). La segunda cohorte está constituida por 86 pacientes americanos en diferentes estadios: 72 con EHmet inicial (F0-F2) y 14 con EHmet avanzado (F3-F4). La tercera cohorte está constituida por 230 pacientes chinos: 125 con cirrosis (F4) y 105 sin patología hepática. Las tres cohortes están compuestas por una muestra metagenómica fecal extraída de cada paciente, y los datos de secuenciación por metagenómica total de estos pacientes fueron descargados a partir de los repositorios de los estudios originales. El Genoma Gastrointestinal Humano Unificado (UHGG) se empleó para identificar las familias de genes fermentativos involucrados en la producción de ACC y AGCC con un efecto sospechado o descrito en el desarrollo de la enfermedad. Posteriormente se cuantificó su abundancia en los metagenomas microbiómicos de los pacientes mediante el alineamiento de secuencias biológicas.

Los genes codificantes de la butiril CoA deshidrogenasa y la butiril-CoA:acetato-CoA transferasa, enzimas del eje metabólico crotonil-butil CoA involucradas en la producción de butirato a través de dos reacciones terminales fermentativas acopladas están involucrados en el desarrollo del EHmet. Además, los genes productores de ACC de reacciones fermentativas conectadas están incrementados en la EHmet. Estos resultados apoyan el uso de los análisis genocéntricos para comprender mejor las alteraciones de los transgénicos asociadas a enfermedades como la EHmet.



DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES QUE EVITAN LA LETALIDAD INDUCIDA POR OSCURIDAD EN CIANOBACTERIAS DEFECTIVAS EN EL CICLO CIRCADIANO

Alfonso Mendaña¹, María Santos-Merino², Raquel Gutiérrez-Lanza¹, Marina Domínguez-Quintero¹, Danny Ducat², Raúl Fernández-López¹

1. IBBTEC, Universidad de Cantabria-CSIC, Santander, Spain

2. MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, United States

alfonso.mendana@unican.es

Las cianobacterias son microorganismos fotótrofos, lo que les permite obtener energía y poder reductor gracias al aprovechamiento de la luz en la fotosíntesis. Sin embargo, como subproducto de su actividad fotosintética, generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que, si no se eliminan correctamente, dan lugar a daño oxidativo y muerte celular. Está ampliamente aceptado que las ROS producidas durante el día son eliminadas por el metabolismo nocturno [1, 2]. En especies con un fuerte carácter circadiano, como *Synechococcus elongatus* PCC 7942, mutantes del ciclo circadiano muestran una acumulación de ROS que se relaciona con la incapacidad de estos mutantes para movilizar las reservas de glucógeno durante la noche [1]. Esta crisis redox conduce a un fenotipo de letalidad inducida por la oscuridad e incapacidad para crecer en condiciones de luz/oscuridad. En este trabajo exploramos cómo la intensidad de la luz y los niveles de CO₂ modulan estos fenotipos en diferentes mutantes circadianos, rescatando de la letalidad a los mutantes de ciclo y mostrando que el control circadiano es prescindible en determinadas condiciones ambientales. Nuestros resultados apuntan a una posible función adaptativa del ciclo circadiano a los cambios en la irradiación y los niveles de CO₂ durante la historia de la Tierra.

Referencias

[1] Diamond, S. et al. (2017) Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1613078114>

[2] Tanaka, K., et al. (2020) Scientific Reports, 10(1), 20029. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77141-8>



Formación, purificación y análisis estructural de complejos proteína-proteína y proteína-ADN de la maquinaria conjugativa del plásmido R388.

Tamara Menquiano, Elena Cabezón, Ignacio Arechaga

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria

menquianot@unican.es

La conjugación bacteriana es el principal medio para la transferencia horizontal de genes. Desde un punto de vista sanitario constituye la vía principal para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Por tanto, descifrar el mecanismo subyacente a este proceso es de gran interés. En la conjugación bacteriana la transferencia de ADN está mediada por el sistema de secreción de tipo IV (T4SS), un gran complejo macromolecular implicado en el transporte del sustrato y la biogénesis del pilus conjugativo. Ambos procesos requieren energía procedente de la hidrólisis de ATP catalizada por ATPasas específicas. En el plásmido conjugativo R388, el sustrato nucleoproteico (relaxosoma), transportado durante el proceso de conjugación bacteriana está formado por el *oriT*, la relaxasa TrwC y las proteínas auxiliares TrwA e IHF. Recientemente, la estructura del T4SS de R388 ha sido resuelta mediante microscopía crioelectrónica de alta resolución. Sin embargo, sigue habiendo muchas incógnitas sobre el mecanismo por el que relaxasa, *oriT* y proteínas accesorias se unen formando el relaxoma y como este es transportado a través del canal de secreción. En este trabajo, hemos formado y purificado los complejos proteicos TrwA-DNA, TrwA-TrwB, TrwC-DNA y TrwB-DNA con el objetivo de resolver mediante cristalografía de proteínas la estructura de dichos complejos, lo que ayudaría a describir los pasos que conducen al transporte del sustrato conjugativo.



Análisis del sistema conjugativo del phylum Cyanobacteria

Antonio Mesa-Galán, Fernando De La Cruz, M. Pilar Garcillán-Barcia

IBBTEC, Universidad de Cantabria – CSIC, Santander, España
antonio.mesa@unican.es

La conjugación bacteriana es uno de los principales mecanismos de transferencia genética horizontal en procariontes. En este proceso, el ADN se transfiere de una célula donadora a una receptora mediante contacto directo. El sistema de formación del par conjugativo (MPF) media la unión entre células y la transferencia de ADN. Actualmente, la conjugación de *Escherichia coli* a cianobacterias constituye el método principal para modificar genéticamente estos organismos. Sin embargo, la evidencia sobre conjugación dentro del phylum *Cyanobacteria* sigue siendo limitada [1]. En este estudio, se realizó un análisis bioinformático de los componentes de la maquinaria conjugativa en genomas de cianobacterias presentes en RefSeq212, provenientes de 17 órdenes taxonómicos distintos. De los ocho MPF caracterizados en procariontes [2], el sistema MPF_C es el único sistema presente en cianobacterias, tanto en plásmidos como en cromosomas. Se identificaron cinco de las nueve clases de relaxasas conjugativas MOB descritas en bacterias [3]. Se identificó un total de 276 plásmidos potencialmente transmisibles por conjugación, de los cuales 85 son conjugativos. Adicionalmente, se detectaron 57 Elementos Integrativos y Conjugativos (ICEs). Los análisis filogenéticos sugieren intercambios recientes de componentes del MPF_C entre plásmidos e ICEs. Un núcleo conservado de cinco componentes del MPF_C se comparte a través de diez órdenes taxonómicos distintos, lo que sugiere un papel esencial en la conjugación entre cianobacterias. No obstante, se observaron variaciones en la sintenia del MPF_C asociadas a diferentes factores. Entre ellas, se vio que los sistemas MPF_C codificados en cromosomas a menudo carecen de los componentes Alr7212 y de la proteína acopladora T4CP. Además, se identificaron genes adicionales en el entorno del gen *virB4* y, por lo tanto, posibles componentes del MPF_C, exclusivamente en los órdenes taxonómicos *Leptolyngbyales* y *Nostocales*. En este último, la presencia de estos genes se correlaciona con relaxasas asociadas específicas. En la mayoría de los MPF_C codificados en cromosomas de *Nostocales*, se encuentran dos homólogos de Alr7209 los cuales exhiben un grado significativo de coevolución.

Referencias

- [1] A. M. Muro-Pastor et al. J Bacteriol, vol. 176, no. 4, pp. 1093–1098, 1994. doi: 10.1128/jb.176.4.1093-1098.1994.
- [2] J. Guglielmini et al. Nucleic Acids Research, vol. 42, no. 9, pp. 5715–5727, 2014. doi: 10.1093/nar/gku194.
- [3] M. P. Garcillán-Barcia et al. Methods Mol Biol, vol. 2075, pp. 295–308, 2020. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_21.

Financiación

Este trabajo está financiado por la ayuda PRE2021-099793 y es parte del proyecto PID2020-117923GB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y el FSE+.

Este trabajo forma parte del proyecto Novel Bacterial Polymers: Exploiting the Green Commons (BACTOPOL). Proyecto de Transición Ecológica y Transición Digital del Plan Estatal de Investigación Científica, referencia: TED2021-129640B-I00.



conAn, un nuevo sistema de antiterminación procesivo asociado a la expresión de los genes de conjugación en muchos de los plásmidos conjugativos de bacterias Gram +.

Andrés Miguel-Arribas¹, Fernando Rojo¹ y Wilfried JJ Meijer²

1, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid; 2, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.

amiguelarr@gmail.com

Una de las principales vías de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos es el intercambio de material genético entre bacterias mediante el proceso de conjugación. Estos genes de conjugación pueden estar presentes en elementos integrativos o bien en plásmidos. La expresión de los genes de conjugación está estrictamente regulada. En nuestro laboratorio estudiamos la conjugación en bacterias Gram positivas (G+) usando como sistema modelo el plásmido pLS20 de *Bacillus subtilis*. Todos los genes de conjugación de pLS20 están localizados en un operón muy largo de más de 30 kb. Aquí presentamos la identificación y caracterización de un sistema de anti terminación procesivo (AT-P), localizado al inicio del operón de conjugación, y que es esencial para la correcta expresión de los genes de conjugación. Este nuevo sistema AT-P está presente en la gran mayoría de operones de conjugación localizados en plásmidos en bacterias G+, y por eso hemos llamado este sistema *conAn* (conjugation Antitermination). En pLS20, el sistema *conAn* es capaz de eliminar más de 20 terminadores transcripcionales ubicados dentro del operón de conjugación. Los sistemas AT-P descritos hasta ahora se basan en un componente, ya sea una proteína o una molécula de RNA. Los sistemas *conAn* están compuestos de dos componentes, una proteína y una molécula de RNA; el RNA es responsable de la antiterminación y la proteína es necesaria para que la antiterminación sea "procesiva". Aparentemente, el sistema *conAn* antitermina terminadores sin discriminación de secuencia. Si esto es así, debería existir una señal de terminación al final del operón de conjugación resistente a la antiterminación, algo que no se ha descrito anteriormente en la literatura. Nuestra suposición es correcta: hemos identificado un terminador al final del operón de conjugación de pLS20 que es resistente a la AT-P de *conAn*. También hemos averiguado el mecanismo molecular que hace que este terminador sea resistente a la antiterminación. El conocimiento de este sistema de antiterminación nos ayuda a comprender la regulación del proceso de conjugación y, por lo tanto, puede tener un impacto importante en la lucha contra la propagación de genes de resistencia a antibióticos.

Estas investigaciones han sido financiadas por los proyectos pid2019_108778gb_c21 y pid2022-141969nb-ioo del ministerio de ciencia e innovación, y por la ayuda Margarita Salas para jóvenes doctores a AM.



“Tail assembly interference is novel and widespread strategy in prokaryotic immune systems”

Miguel-Romero L*, Lingchen H*, Alqurainy N, Rocha EPC, Fillol-Salom A, Penadés JR.

**These authors contributed equally*

Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)

lmiguel@ibv.csic.es

The prokaryotic immune systems are diverse, and recent studies have highlighted that these are not just encoded in the bacterial chromosomes, but also on MGEs. While bacteria employ these immune systems to protect themselves against MGE infections, the immune systems encoded within MGEs are used for inter-MGEs competition. What are the consequences of these conflicts, and how they impact bacterial and MGEs evolution, is an interesting topic of research. Recent studies have identified several bacterial immune systems that sense phage structural components, such as capsid or tail proteins. However, the aforementioned immune systems act as abortive infection system, sensing the phage infection through their structural component and activating their effector, which usually produce growth arrest or cell suicide. No immune system with the ability to target and inhibit the function of a phage structural component has been described so far. Here, we report the discovery of a new family of immune systems called Tai (for tail assembly inhibition), which specifically block tail assembly formation, releasing tailless phages that are incapable of infecting new hosts. Our work is the first evidence that a phage structural pathway, specifically tail formation, is directly inhibited, producing non-viable virion particles. Therefore, the Tai systems act as a population defense mechanism. The Tai systems are encoded in different MGEs, such as phages and phage satellites, and have the remarkable ability to block tail formation in unrelated phages. Importantly, we observed that some phages could be affected by the cognate Tai-encoded protein. In this scenario, and to prevent autoimmunity, phages encode an associated counter-defense mechanism. Moreover, while the Tai immune systems are constitutively expressed, conferring immunity to the cells that carry the MGE encoding Tai, the counter-defense protein is only expressed during the lytic cycle of the phage, which then allows tail formation. This fine-tuned expression occurs because the genes expressing the immune system and its counter-defense are located in a non-contiguous operon that allows their coordinated expression. Our results reveal the existence of a new strategy that protects bacteria from phage attacks and we suggest that immune systems and counter-defense are highly prevalent into MGE genomes.



Caracterización de HsbA, un represor de la formación de biofilm en *Pseudomonas Putida*

Elisa Montero-Beltrán, Marta Pulido-Sánchez, Aroa López-Sánchez y Fernando Govantes

Centro Andaluz del Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide

emonbel@alu.upo.es

La transición entre el estado de vida planctónico y la formación de biofilm es un proceso estrictamente regulado en diferentes bacterias. La presencia de niveles intracelulares elevados del segundo mensajero di-GMPc están asociados con formación de biofilm mientras que niveles bajos promueven la dispersión del biofilm y la producción de flagelos. En *Pseudomonas aeruginosa*, el factor anti-anti- σ HsbA regula positivamente tanto la transcripción de genes flagelares dependientes del factor σ alternativo FliA como la formación de biofilm. En esta bacteria, la actividad de HsbA está controlada por una cascada de fosforilación, mediada por la histidina quinasa HptB y el regulador de respuesta HsbR.

En este trabajo se ha caracterizado el posible papel de HsbA, HsbR y HptB en la regulación del ciclo de desarrollo del biofilm y la síntesis del flagelo en *Pseudomonas putida* mediante ensayos de formación de biofilm y expresión génica. Nuestros resultados muestran que HsbA regula negativamente la formación de biofilm en fase estacionaria tardía, impidiendo la acumulación intracelular de di-GMPc. Este papel es independiente de la función de HsbR y HptB. La producción ectópica de una versión no fosforilable de HsbA complementa los fenotipos observados en el mutante $\Delta hsbA$, mientras que la producción ectópica de una versión que mimetiza el estado fosforilado da lugar a una complementación parcial. Por tanto, el estado de fosforilación de HsbA afecta a su función en la regulación de la formación del biofilm. Sorprendentemente, el análisis de la expresión de promotores dependientes de FliA no apoya la implicación de HsbA en la regulación de la síntesis de componentes flagelares. Así, nuestros resultados indican que, pese a que *P. aeruginosa* y *P. putida* presentan los mismos elementos reguladores, estos son funcionalmente diferentes, reflejando la adaptación de estas bacterias a sus diferentes estilos de vida.



Engineering phagemids to tackle plasmid-mediated antibiotic resistance

Ada Muñoz-Cazalla, Laura Álvaro-Llorente, Laura Jaraba-Soto, Ana Elena Pérez-Cobas, Cristina Herencias, Jerónimo Rodríguez-Beltrán

Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

munozada06@gmail.com

Antibiotic resistance (AR) genes are tightly linked to plasmids, which they use as a vehicle to transfer horizontally across bacterial populations. Owing to their dissemination potential, plasmid-mediated AR poses a clinically relevant challenge. In particular, hospitalized patients are colonized by resistant bacteria that are difficult to treat and detect as they do not cause infections. These resistant populations spread AR to the rest of the microbiota or to other patients, thereby behaving as an AR reservoir. To address asymptomatic colonization, we have engineered a phagemid –a vector with both plasmid and phage properties– to pack the CRISPR/Cas9 system targeting AR genes into a viral capsid. Once the CRISPR/Cas9 is delivered into the cell by the phagemid, a specific sgRNA recognizes the target AR gene, and Cas9 endonuclease then produces a double-stranded break, leading to plasmid loss. We demonstrate that *ex vivo* phagemid treatment of fecal samples can selectively and highly efficiently (>99.999%) eliminate plasmid populations harboring AR genes. This system selectively eliminates problematic mobile genetic elements without affecting the cell, so the patient microbiota diversity and richness are conserved. Treated stool samples can then be later reintroduced into the colonized patient, displacing AR populations. This novel strategy promises to eradicate the plasmid-mediated AR reservoir while hampering HGT and AR spread.



Regulación antisentido de la glutamina sintetasa en una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos

Isidro Álvarez-Escribano, Belén Suárez-Murillo, Manuel Brenes-Álvarez, Agustín Vioque, Alicia M. Muro-Pastor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. CSIC y Universidad de Sevilla, Sevilla, España

alicia@ibvf.csic.es

La glutamina sintetasa (GS) es un enzima clave para la asimilación de nitrógeno y para el mantenimiento del balance C/N, por lo que está sometida a una estricta regulación en todas las bacterias. La GS de enterobacterias, el caso mejor estudiado, está regulada por inhibición feedback y por adenililación reversible. En contraste con otras bacterias, la GS cianobacteriana presenta un mecanismo de regulación completamente distinto basado en la interacción reversible con pequeñas proteínas denominadas factores inactivantes (inactivating factors, IFs). Los genes que codifican estos factores inactivantes aparecen en número variable en los genomas secuenciados y en el caso de *Nostoc* sp. PCC 7120 hay un único factor inactivante codificado por el gen *gifA* (glutamine synthetase inactivating factor A).

A nivel transcripcional, tanto el gen que codifica la glutamina sintetasa (*glnA*) como los genes que codifican los factores inactivantes están regulados de manera opuesta por NtcA, el regulador global de la asimilación de nitrógeno en cianobacterias. En condiciones de limitación de nitrógeno, NtcA activa la transcripción de *glnA* al tiempo que reprime la transcripción de los genes que codifican los factores inactivantes. Por el contrario, en presencia de amonio, se desreprime la expresión de los factores inactivantes, contribuyendo a reducir la actividad de la proteína GS.

En base a un análisis transcriptómico global de *Nostoc* sp. PCC 7120 (1) hemos definido que la transcripción de los genes *glnA* y *gifA* se produce en dos unidades transcripcionales convergentes y que el transcrito de *gifA* se extiende en disposición antisentido del transcrito *glnA*. El transcrito *gifA*, por tanto, puede considerarse un RNA dual con dos regiones funcionales, una región 5' codificante de IF7 y una región 3' no codificante que actuaría como un antisentido de *glnA*. Incrementando los niveles de antisentido tanto en *cis* como en *trans* hemos podido demostrar que la cantidad de glutamina sintetasa se puede modular en función de la cantidad de antisentido. La disposición convergente de los genes *glnA* y *gifA* en muchas cianobacterias filamentosas que solo codifican un factor inactivante sugiere que este mecanismo antisentido podría ser general en este grupo de cianobacterias.

Referencia:

- (1) Brenes-Álvarez, M., Vioque, A., Muro-Pastor, A. M. (2023) Nitrogen-regulated antisense transcription in the adaptation to nitrogen deficiency in *Nostoc* sp. PCC 7120. PNAS Nexus2: pgad187 <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad187>

Financiación:

PID2019-105526GB-I00 y PID2022-138128NB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033, FEDER, UE), Iniciativa Europea de Empleo Juvenil (Junta de Andalucía y FSE) y contrato predoctoral PREP2022-000554 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FSE+).



Una nueva mini-proteína induce la formación de agregados extracelulares que atrapan las lipasas de *Staphylococcus aureus*

Ane Muruzabal-Galarza, Arancha Catalán-Moreno, Pedro Dorado-Morales, Jaione Valle, Alejandro Toledo-Arana

Instituto de Agrobiotecnología (IdAB-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Gobierno de Navarra, Avenida de Pamplona 123, Mutilva (Navarra).

ane.muruzabal@csic.es

Recientemente, abordajes masivos como la proteómica *shotgun* o la RIBO-seq (que mapea la posición de los ribosomas sobre los mRNAs) han demostrado la existencia de marcos de lectura abiertos pequeños (smORFs) que están siendo traducidos pero que no están anotados en los genomas. Esto se debe a que los algoritmos de anotación excluyen a las ORFs menores de 50 aminoácidos si no cuentan con un homólogo en las bases de datos. Por ello, en todos los genomas secuenciados existe lo que se conoce como el proteoma oculto. Nuestro grupo y otros hemos identificado las smORFs ocultas de *Staphylococcus aureus*, una bacteria patógena de gran relevancia clínica que puede causar una gran variedad de infecciones. En este trabajo nos centramos en el estudio de dos smORFs localizadas en las 5' y 3'UTRs del mRNA de *sal1*, que codifica para una de las dos lipasas extracelulares, factores de virulencia importantes que produce este patógeno. Ambas mini-proteínas, de 21 aminoácidos, están altamente conservadas en el género *Staphylococcus*, y las denominamos LspU y LspD, por *Lipase associated small protein, upstream o downstream*, respectivamente. La predicción de estructura reveló que LspU y LspD forman una hélice anfipática similar a las *Phenol Soluble Modulins* (PSMs), toxinas implicadas en el biofilm y en la citotoxicidad. Observamos que la expresión constitutiva de LspU producía también la agregación bacteriana y la formación de anillo, además de disminuir la actividad lipasa del medio extracelular. Demostramos que LspU es exportada por los mismos transportadores que translocan a las PSMs, indicando que podría ser un nuevo miembro de esta familia de toxinas. Mediante diferentes metodologías, observamos que la disminución de la actividad lipasa en los sobrenadantes se debía a que las lipasas eran atrapadas en agregados proteicos extracelulares, que decantaban junto con las células durante la centrifugación. Los agregados estaban conformados mayoritariamente por LspU y lipasas, que conservaban su actividad, pero podían ser disgregados mediante SDS. En resumen, estos resultados sugieren que LspU podría retener a las lipasas para evitar su dispersión en el medio extracelular, manteniéndolas activas cerca de las propias bacterias y así maximizar la utilización de sus productos derivados.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación a través de los proyectos PID2019-105216GB-I00 y PID2022-136696NB-I00. Ane Muruzabal es investigadora predoctoral del Programa FPU del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU20/05496)



The use of bacterial consortia isolated from WWTPs for ibuprofen bioremediation: a solution to the problem of emerging contaminants.

Pilar Navarro-Gómez, Zaki Saati-Santamaría, Juan A. Martínez-Mancebo, Maitane Juárez-Mugarza, Amando Flores and Inés Canosa

Universidad Pablo de Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo/ Consejo Superior de Investigaciones Científicas/ Junta de Andalucía (UPO/CSIC/JA), Carretera de Utrera, Km. 1. 41013 Sevilla, España. Email: pnavarro2@us.es

The continuous and regular use of pharmaceuticals, recognised as emerging pollutants, has led to their widespread environmental accumulation, which is manifested by their release into wastewater that cannot be effectively treated. There is therefore a need to investigate effective degradation mechanisms for these sources of pollution. In this work, we present the isolation and characterisation of four ibuprofen (IBU) degrading consortia obtained from WWTPs located in two distant cities in Andalusia, by enrichment processes using ibuprofen as sole carbon and energy sources.

Using a metagenomic approach, we identified the microbial populations involved in IBU degradation and established the possible evolution of the consortia components during the enrichments. The analysis of the presence and distribution in the consortia of *ipf* genes, previously associated with IBU biodegradation (Aguilar-Romero et al., 2021; Aulestia et al., 2021; Murdoch & Hay, 2013) showed that they are mobilised through the microbial community. Additionally, we found that the genes involved in the upper and lower biodegradation pathways show different expression patterns among parental and evolved consortia and with respect to a previously isolated degrading organism (ref). This study highlights the transfer of genetic data between microorganisms, showing their adaptability to varied conditions and representing a significant advancement in biotechnological applications of biodegradation processes.

Fundings:

This work has been funded by the Programa de Excelencia de la Junta de Andalucía

(ProyExcel_00358) and the Margarita Salas Program from the Ministerio de Universidades funded by Unión Europea -NextGenerationEU

Refs:

Aguilar-Romero, I., De la Torre-Zúñiga, J., Quesada, J. M., Haïdour, A., O'Connell, G., McAmmond, B. M., Van Hamme, J. D., Romero, E., Wittich, R.-M., & van Dillewijn, P. (2021). Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: Metabolic processes. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 274, 116536. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116536>

Aulestia, M., Flores, A., Mangas, E. L., Pérez-Pulido, A. J., Santero, E., & Camacho, E. M. (2021). Isolation and genomic characterization of the ibuprofen-degrading bacterium *Sphingomonas* strain MPO218. *Environmental Microbiology*, 23(1), 267-280. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15309>

Murdoch, R. W., & Hay, A. G. (2013). Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas* Ibu-2. *Microbiology* (Reading, England), 159(Pt 3), 621-632. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062273-0>



La anaerobiosis modula la función de los genes de resistencia

Laura Ortiz, Amalia Prieto, Alberto Hipólito, Nicolas Kieffer, Ester Vergara, José Antonio Escudero

Facultad de Veterinaria, VISAVET, UCM

lortiz05@ucm.es

La resistencia antibiótica supone una gran amenaza para la medicina moderna. Los integrones juegan un papel protagonista en la aparición y diseminación de la resistencia, especialmente en enterobacterias, donde son muy prevalentes (1). Estas plataformas genéticas son capaces de reclutar y portar a nuestros hospitales 177 *cassettes* de resistencia antibiótica (ARCs).

La caracterización de los genes de resistencia antibiótica normalmente se realiza bajo condiciones de laboratorio, lo que puede significar que estas difieran de las condiciones reales en las que estos genes tienen importancia clínica. Por ejemplo, el ambiente del tracto intestinal, donde se encuentran las enterobacterias, es anaerobio. Para comprobar el efecto de la anaerobiosis en la actividad de estos genes medimos, en condiciones de ausencia de oxígeno, el perfil de resistencia, mediante CMI y antibiograma, de una colección de 136 ARCs en *E. coli* MG1655 (2), aislados humanos y plásmidos clínicos.

A pesar de observar un efecto general de la anaerobiosis en la resistencia natural de *E. coli*, cuando comparamos el efecto de los ARCs con el vector vacío, observamos para algunas combinaciones de genes y antibióticos una clara desviación de la tendencia observada en la cepa parental. Por ejemplo, *fosI* mantiene un *fold-change* mayor en aerobiosis frente a la fosfomicina, mientras que *fosE* lo mantiene en anaerobiosis. Un caso muy particular es el del gen *bla_{VIM-1}*, ya que ve reducida su actividad frente a ertapenem hasta 128 veces en ausencia de oxígeno, lo que permite situar su CMI en *E. coli* por debajo del punto de corte clínico.

Esta diferencia en el comportamiento de los genes/antibióticos también la observamos en los aislados y plásmidos clínicos, moviéndose incluso el punto de corte clínico, por lo que no es un fenómeno exclusivo de nuestra plataforma.

Gracias a los datos obtenidos en este trabajo podemos concluir que los efectos producidos por los ARCs pueden ser muy diferentes, en intensidad e incluso signo, según la disponibilidad de oxígeno. Este fenómeno podría permitir usar estrategias terapéuticas inicialmente descartadas si al realizar las mediciones rutinarias *in vitro* en el laboratorio se tuviera en cuenta las concentraciones de oxígeno presentes en el foco de infección.

1. Escudero, José Antonio et al. "The Integron: Adaptation On Demand." *Microbiology spectrum* vol. 3,2 (2015): MDNA3-0019-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014
2. Hipólito, A., García-Pastor, L., Vergara, E. et al. Profile and resistance levels of 136 integron resistance genes. *npj Antimicrob Resist* 1, 13 (2023). <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00014-3>



Paving the way to understand the overrepresentation of *Listeria monocytogenes* hypervirulent clones in dairy products

Carla Palacios-Gorba^{a,c}, Alba Espí-Malillos^{a,c}, Jesús Gomis^{b,c}, Inmaculada López-Almela^{a,c}, Ángel Gómez-Martín^{b,c}, Pilar Ruiz-García^c, María Carmen López-Mendoza^e, Francisco García-Del Portillo^d, M Graciela Pucciarelli^{d,e}, Juan J. Quereda^{a,c}

^a*Listeria*: Biology and infection Research group

^bMicrobiological Agents Associated with Animal Reproduction (ProVaginBIO) Research Group

^cDepartamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain

^dLaboratory of Intracellular Bacterial Pathogens, National Centre for Biotechnology (CNB)-CSIC, Madrid, Spain.

^eDepartment of Molecular Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Centre of Molecular Biology 'Severo Ochoa' (CBMSO CSIC-UAM), Madrid, Spain.

carla.palaciosgorba@uchceu.es , juan.quereda@uchceu.es

Listeriosis, caused by *Listeria monocytogenes* (*Lm*), is a disease associated with consumption of contaminated food. Previous studies showed that hypervirulent clones of *Lm*, implicated in human clinical cases, are overrepresented in dairy products¹. We have analyzed *Lm* clones circulating in dairy ruminant farms to decipher whether the overrepresentation of hypervirulent clones in dairy products is consequence of their association with the ruminant host or whether there is growth advantage in this type of food. We conducted a large-scale longitudinal study to monitor *Listeria* spp. in 19 dairy ruminant farms (N = 3251 samples)². Whole genome sequencing and cgMLST (core genome multilocus sequence typing) were performed on all isolates. In addition, we examined the growth kinetics of five hyper- (Clonal Complex (CC)1, CC4, CC6) and hypovirulent *Lm* isolates (CC9 and CC121) at 37 and 4 °C in raw milk and UHT. Finally, proteomic studies of *Lm* in UHT milk were performed to understand the molecular adaptation of the membrane and cell wall to a host medium such as milk. Our results show that ruminant hosts may favour the selection of CC1 and CC4 hypervirulent clones of *Lm* in the gut. However, hypovirulent isolates exhibited better growth parameters in milk at food preservation temperatures (4°C). In contrast, hypervirulent isolates showed better growth rates in UHT milk at host temperature (37 °C)³. Proteomic analysis of CC1 and CC9 isolates showed that they respond to UHT milk differently with a common pattern and a CC-specific pattern. Overexpressed proteins have been identified in milk, including members of the LPxTG family, phosphotransferase systems, and diaminopimelate decarboxylase. Therefore, the overrepresentation of hypervirulent clones of *Lm* in dairy products made from raw milk appears to be due to contamination during or after on-farm milking and rules out a growth advantage of these isolates in dairy products when stored at refrigeration temperatures.

¹ Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, *et al.*. *Nat Commun.* 2019;10(1):2488.

² Palacios-Gorba C, Moura A, Gomis J, *et al.*. *Environ Microbiol.* 2021;23(12):7617-7631.

³ Espí-Malillos A, Palacios-Gorba C, López-Almela I, *et al.* *Microbes Infect.* Published online February 10, 2024.

We thank the WHO Collaborating Centre and National Reference Centre for Listeria (Institut Pasteur, Paris) for sequencing and typing the isolates. This work was supported by: Grant from Generalitat Valenciana (AICO/2021/278) (J.J.Q), Grant PID2022-137961OB-I00 (J.J.Q) and PGC2018-096364-B-I00 (M.G.P), funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ERDF/EU, Grant RYC-2018-024985-I (J.J.Q) and RYC2021-032245-I (A.G.M) funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and ESF Investing in your future and Grant from Universidad CEU Cardenal Herrera (GIR23/34). Alba Espí-Malillos is supported by a Predoctoral contract from the Universidad Cardenal Herrera-CEU.



Molecular insights into the many-to-one function of fungal His-phosphotransfer proteins.

Francisco Paredes-Martínez^{1,2}, Lluís Eixerés³, Sara Zamora³, Patricia Casino^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de València; ²Instituto Universitario de Investigación en Biotecnología y Biomedicina, Universitat de Valencia,

³Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC.

franpa9@uv.es

Phosphorelay systems are complex Two-Component Systems present in bacteria, fungus and plants, but absent in animals (1-4). They are comprised of a hybrid Histidine Kinase (hHK), a Histidine phosphotransferase (HPt), and a response regulator. Upon receiving a signal, the hHK autophosphorylates in a conserved His and then the phosphoryl group is transferred to a phosphorylatable Asp in the receiver domain (REC) of its polypeptide chain. Subsequently, the phosphoryl group is transferred to a phosphorylatable His in HPt and, finally, it is transferred to a phosphorylatable Asp in another REC domain of a response regulator.

In fungi, the number of hHK varies in species, but only one HPt (5,6). Our present study tries to shed light into the mechanism of this many-to-one phosphotransfer role of the HPt in fungal phosphorelay systems.

For that purpose, we have produced REC domains of five hHK of *C. thermophilum* and its HPt, and performed their phosphorylation and phosphotransfer to Ct_HPt, which was analyzed using native gels. Phosphotransfer of REC_{hHK6}, REC_{hHK3} and REC_{hHK5} to Ct_HPt was observed in short incubation times at room temperature. Affinities for binding interaction between these REC domains to Ct_HPt were measured with Microscale Thermophoresis obtaining K_D values in the low micromolar range, indicating low affinity binding. We also determined the structure of Ct_HPt in complex with REC_{hHK6} bound to the phosphomimetic BeF₃⁻. Comparison with the complex of HPt Ypd1 with REC_{Sc_Sln1} from *S. cerevisiae* revealed that REC_{hHK6} did not show the Y-T mechanism of phosphoryl stabilization, nor the Leu-Thr switch. Furthermore, we determined the structures of REC_{hHK3} and the REC domain from *C. albicans* (REC_{Cal_Sln1}) which did not bind phosphomimetic, proposing a transient binding of the phosphoryl group in these fungal REC domains.

Finally, Ypd1 from *C. albicans* (Cal_Ypd1) was produced and analysed by SEC-SAXS, revealing a flexible long loop α D- α E, in comparison to Ct_HPt, whose structure revealed a shorter loop and a longer N-terminal. REC_{Cal_Sln1} showed phosphotransfer capacity to Cal_Ypd1, even in the absence of the loop α D- α E in a mutant Cal_Ypd1. Therefore, it is not yet clear which is the functional relevance of this flexible extensions.

Bibliography:

1. Appleby JL et al. Cell 86, 845–848 (1996);
2. Bourret RB et al. Trends Microbiol 29, 883–893 (2021);
3. Stock et al. Annual Review of Biochemistry vol. 69 183–215 (2000);
4. Zhang W et al. Microbiology (N Y) 151, 2159–2173 (2005);
5. Posas F et al. Cell 86, 865–875 (1996);
6. Fassler JS et al. Eukaryot Cell 12, 1052–1060 (2013)

Funding:

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (Grants PID2019-110630GB-I00 and PID2022-141621NB-I00 to P.C).



The expression of integron arrays is shaped by the translation rate of cassettes

André Carvalho^{1,2*}, Alberto Hipólito^{1,2}, Filipa Trigo da Roza^{1,2}, Lucía García-Pastor^{1,2}, Ester Vergara^{1,2}, Aranzazu Buendía², Teresa García-Seco² and José Antonio Escudero^{1,2*}

¹ Molecular Basis of Adaptation. Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

² VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*Correspondence: jaescudero@ucm.es, apaulino@ucm.es

Integrans are key elements in the rise and spread of multidrug resistance in Gram-negative bacteria. These genetic platforms capture cassettes containing promoterless genes and stockpile them in arrays of variable length. In the current integron model, expression of cassettes is granted by the Pc promoter in the platform and is assumed to decrease as a function of its distance. Here we explored this model using a large collection of 136 antibiotic resistance cassettes and show that the effect of distance is in fact negligible. Instead, cassettes have a strong impact in the expression of downstream genes because their translation rate affects the stability of the whole polycistronic mRNA molecule. Hence, poorly translated cassettes decrease the expression and resistance phenotype of cassettes downstream. Our data puts forward a novel integron model in which expression is contingent on the translation of cassettes upstream, rather than on the distance to the Pc.



An experimental study of the D-glutamate racemase activity in the uncultivated CPR bacterium *Saccharimonas aalborgensis*

Marcos Peñalver^{1,2,3}, Alberto Paradela⁴, César Palacios-Cuéllar¹, M. Graciela Pucciarelli^{1,2,3}, and Francisco García-del Portillo^{1*}

¹Laboratory of Intracellular Bacterial Pathogens. National Centre for Biotechnology (CNB-CSIC). Madrid, Spain

²Department of Molecular Biology, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

³Centre for Molecular Biology "Severo Ochoa" (CBMSO)-CSIC, Madrid, Spain

⁴Proteomics Facility, National Centre for Biotechnology (CNB-CSIC). Madrid, Spain

marcos.pennalver@uam.es

Candidate Phyla Radiation (CPR) was first described in 2015 as a monophyletic group of bacteria. Since then, it has expanded in number and taxa, especially after the notable increase in metagenomic studies. CPR comprises widespread uncultivated bacteria with ultra-small sizes ($\leq 0.2 \mu\text{m}$ in length), streamlined genomes ($\leq 1.5 \text{ Mb}$) and limited metabolic capacities. These features support the episymbiotic and parasitic lifestyles proposed for these bacteria. The existence of a yet uncharacterized cell wall in CPR bacteria is supported by the presence in their surfaces of electron-dense material that resemble S-layers anchored to the peptidoglycan (PG) as well as by the defined shapes exhibited by these bacteria, mainly coccoid or rod. Intriguingly, most CPR bacteria lack the minimal set of enzymes required to synthesize peptidoglycan (PG), making enigmatic how they produce this essential component. We analyzed in complete genomes representing CPR bacteria the distribution of genes encoding D-amino acid racemases producing the universal PG components D-glutamate (D-Glu) or D-alanine (D-Ala), plus moonlighting enzymes that have been described to synthesize D-Glu or D-Ala as a side reaction. Unlike other phyla of the domain Bacteria, CPR bacteria lack known moonlighting activities and, at most, have one gene encoding either Glu or Ala racemase. One of these orphan enzymes is a predicted Glu racemase (MurI_{CPR}) from the CPR bacterium *Candidatus Saccharimonas aalborgensis*. MurI_{CPR} expression restores growth of a *Salmonella* D-Glu auxotroph lacking its endogenous racemase and results in the substitution of L-Ala by serine as first residue in a fraction of the PG stem peptides. In vitro, MurI_{CPR} racemizes exclusively Glu as a substrate among the canonical amino acids. *Saccharimonas aalborgensis* may therefore couple Glu racemization to serine and D-Glu incorporation into the stem peptide in concert with the Mur ligases. Our findings provide first insights into the synthesis of PG by an uncultivated bacterium and demonstrates how to test experimentally enzymatic activities related to PG metabolism from uncultivated CPR bacteria.



Los elementos genéticos móviles definen la estructura no aleatoria del pangenoma del *Salmonella entérica* serovar Typhi

Arancha Peñil-Celis¹, Santiago Redondo-Salvo^{1,2}, Luis Vielva³, M Pilar Garcillan-Barcia^{1,*}, Fernando de la Cruz^{1,*}

¹ Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, (CSIC, Universidad de Cantabria), Santander, Spain

correo electrónico

² Biomar Microbial Technologies, León, Spain

³ Departamento de Ingeniería de las Comunicaciones, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

El serovar Typhi de *Salmonella enterica* (Typhi) sigue siendo una amenaza significativa para la salud global, causando millones de casos de fiebre tifoidea anualmente. La emergencia de cepas de Typhi multirresistentes y extensamente resistentes a los medicamentos subraya la urgencia de una vigilancia mejorada de los perfiles de resistencia antimicrobiana. Tradicionalmente, los sistemas de vigilancia genómica en salud pública se han enfocado en medir la relación del genoma utilizando solo loci cromosómicos. Sin embargo, la naturaleza clonal de Typhi y la dinámica compleja de los elementos genéticos móviles desafían los métodos de vigilancia actuales. En este estudio, aplicamos el Índice Jaccard (JI) para analizar el papel del pangenoma de Typhi en una colección de más de 2200 genomas aislados en EEUU. Este análisis revela una estructura no aleatoria en el pangenoma de Typhi, predominantemente impulsada por la ganancia y pérdida de elementos genéticos móviles, confirma y amplía los patrones epidemiológicos conocido y revela nuevas dinámicas de plásmidos. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la salud pública, ya que permiten una mejor resolución para la detección e investigación de brotes y el rastreo de cepas emergentes resistentes a los antibióticos y destaca el valor del genoma accesorio para deducir la epidemiología y evolución del patógeno. En definitiva, este enfoque multidimensional ofrece una visión más amplia y compleja para entender la evolución de los patógenos.



In search of metabolic targets of *Streptococcus suis* that are essential for pig colonization

[Ayelén Perez Falcón](mailto:ayelen.perez@irta.cat)¹, Maria Juanpere Borrás², Karl Kochanowski¹, Peter van Baarlen², Jerry Wells², Florencia Correa-Fiz¹, Virginia Aragón¹.

¹ Unitat mixta d'Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, 08193, Catalonia. Spain.

² Host-Microbe Interactomics. Dept. Animal Sciences. Wageningen University and Research, Netherlands.

ayelen.perez@irta.cat

Antimicrobial resistance is a major challenge to human health, and while prudent use of antimicrobials can slow down the development of AMR, it cannot solve the challenges caused by multi-drug resistant (MDR) bacteria. *Streptococcus suis* is an important porcine pathogen, which requires frequent use of antibiotics to avoid high morbidity and mortality in intensive pig production. The increased emergence of MDR *S. suis* isolates has recently become a global concern. *S. suis* strains of different virulence can be found colonizing the mucosa of pigs. An early exclusion of virulent *S. suis* isolates from the respiratory mucosa would consequently yield a reduction in the prevalence of *S. suis* disease. Our study involves characterizing *S. suis* metabolism under conditions mimicking the natural host, the pig. Metabolic models built based on genome sequences from virulent and non-virulent *S. suis* isolates indicated the presence of metabolic diversity. However, it was difficult to associate this diversity with the virulence of the strains, due to the low number of non-virulent strains available. In the laboratory, the growth of *S. suis* virulent P1/7 and non-virulent T15 strains was evaluated in different media. To mimic the natural environment of colonization, a synthetic nasal medium (SNM) supplemented with 0.5% mucin was used, while the standard laboratory culture medium Todd-Hewitt broth with 2% Yeast extract (THY) was used as control. T15 grew to higher density in SNM than P1/7, suggesting better colonization capacity of the nasal niche by the non-virulent strain. With the goal of identifying metabolic genes necessary for P1/7 colonization of pigs, a transposon-based approach (TnSeq) was established. Preliminary time course experiments with wild type P1/7 indicated that the optimal time for TnSeq library screening was 4h, since after this time bacterial viability was reduced independently of the growth medium. Finally, to identify metabolic genes necessary for proliferation under host-mimicking conditions, the P1/7 library was screened in THY (as control), SNM with and without mucin, saliva of pigs and nasal porcine organoids. In addition, the library was screened in the presence of other commensal bacteria to mimic the interaction within the respiratory microbiota.

Funding: INNOTARGETS, European Union Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 956154.



Deciphering the role of extracellular matrix components in microbial dialogue between *Bacillus* and pathogenic fungi

Alicia I. Pérez-Lorente¹, Carlos Molina-Santiago¹, David Vela¹, Paolo Stincone², Abzer K Pakkir Shah^{2,3}, Antonio de Vicente¹, Daniel Petras^{2,3}, Diego Romero¹.

¹ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Málaga, Spain.

² University of Tuebingen, CMFI Cluster of Excellence, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, Tuebingen, Germany

³ University of California Riverside, Department of Biochemistry, Riverside, USA

perezlorente@uma.es

In nature, bacteria frequently form bacterial communities known as biofilms, where cells are embedded within an extracellular matrix (ECM) that provides protection against external aggressions or facilitates the efficient uptake and utilization of available resources. Interactions with other microbes can notably alter the community structure and, consequently, the nature of the relationship with the environment¹. Previous studies of our laboratory have demonstrated the significance of biofilm formation in the antagonistic interaction between *Bacillus* and fungi in the melon phyllosphere². Our hypothesis is that the ECM plays a complementary role to the structural aspects of this antagonistic interaction.

In this study, we dissect how the different components of *Bacillus* ECM mediate the adhesion of bacterial cells to *Botrytis* hyphae, which could enhance the efficient release of antifungal metabolites. We also describe how several purified components of the ECM and specific secondary metabolites of *Bacillus* participate in the chemical communication between *Bacillus* and *Botrytis*, thereby altering the physiology, metabolism, and ultrastructure of *Botrytis*. These alterations lead to clearly differentiated cellular and physiological responses. Additionally, we have observed that during this interaction, specially chitosan, a structural component of fungal cell walls, disrupts the formation of biofilm formation of *Bacillus*, by impeding the efficient polymerization of a biofilm related pili. We also describe that during this antagonistic interaction with *Bacillus*, *Botrytis* secretes different oxylipins, defence molecules capable of killing *Bacillus*. In response, *Bacillus* increases the production of several secondary metabolites, which appears to have antifungal effects.

Our results underscore the urgency of further investigation of these interactions with the aim of identifying and describing adaptation processes that either lead to the exclusion or coexistence of two initially antagonistic microorganisms.

[1] Dragoš A, Kovács ÁT. Trends Microbiol. 2017 Apr;25(4):257-266. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.010. Epub 2017 Jan 11. PMID: 28089324.

[2] Berlanga-Clavero, M.V., Molina-Santiago, C., Caraballo-Rodríguez, A.M. et al. Nat Microbiol 7, 1001–1015 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01134-8>

This work was supported by grants from an ERC Starting Grant (BacBio 637971), Plan Nacional de I+D+i of the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107724GB-I00), and Junta de Andalucía (P20_00479). A.I.P.L. is funded by the program FPU (FPU19/00289).



Conditional PC/Cyt mutants in defective soluble electron carriers *Synechocystis sp.* PCC 6803 strain.

Carmen Pérez-Nieto, Manuel Hervás, José M Ortega, Mercedes Roncel, Jose A Navarro, Luis López-Maury

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC

mcarmen.perez@ibvf.csic.es

Oxygenic photosynthesis affects almost all life on Earth. It's considered to be the primary source of oxygen and plays a key role in the carbon cycle. Cyanobacteria, the evolutionary precursors of chloroplast, are the simplest organisms able to perform oxygenic photosynthesis, therefore, these organisms make a key contribution to global primary production, especially in the oceans. In photosynthesis sunlight converts to chemical power when a photon excites PSII generating electrons via water splitting. In cyanobacteria, photosynthesis and respiration share some common elements of the electron transport chain, nonetheless, many aspects of the molecular pathways are still unclear.

In the photosynthetic electron transfer cytochrome c6 or plastocyanin are two alternative soluble electron carriers between cytochrome b6f complex and photosystem I. Expression of these two proteins is controlled by copper availability, PC is expressed in the presence of copper and Cc6 in its absence. The presence of one of the two genes is essential as a fully segregated double mutant is not viable. We have generated a conditional mutant lacking both endogenous genes but carrying an arsenite-inducible promoter tightly controlling expression of either *petE* (coding for PC) or *petJ* (coding for Cc6). Growth of these strains and expression of the proteins is arsenite dependent. Biophysics analysis of the photosynthetic electron chain under non-permissive conditions showed that it is completely blocked but they still contain both photosystems. Surprisingly, they survive for long periods of time under non-permissive conditions and keep their pigments. Preliminary physiological characterization of these strains will be presented.

Grants PID2020-112645GB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and TED2021-129165B-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by "European Union NextGenerationEU/PRTR"



Engineering *E. coli* bacteria for coinjection of ART toxins into PD-L1+ mouse tumor cells

Eva Pico Sánchez, Alejandro Asensio-Calavia, and Luis Ángel Fernández.

Department of Microbial Biotechnology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Madrid 28049, Spain.

epico@cnb.csic.es

Current cancer therapies are inefficient for solid tumors and radically new approaches are needed to improve clinical outcome. Bacteria have been investigated as therapeutic agents in cancer treatments due to their natural capacity to colonize and proliferate in solid tumors, which in combination with their intrinsic immunogenicity, are advantageous for cancer therapies. In our group, we use synthetic biology for engineering non-pathogenic *Escherichia coli* K-12 chassis with functional genetic modules for the development of bacteria-based cancer therapies. We have recently developed Synthetic Injector *E. coli* (SIEC-X) strains carrying: i) a protein injection module based on the Type III Secretion System (T3SS) from enteropathogenic *E. coli* (EPEC); ii) a protein cargo module for injection of the catalytic domains of ADP-ribosyl transferase (ART) toxins; iii) a three-repressor regulatory module (3R-X) to control T3SS and cargo expression; iv) an adhesion module based on synthetic adhesins (SAs) enabling to program the adhesion of bacteria toward an antigen expressed by the surface of tumor cells. SIEC-X strains binding to human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and carrying one ART-toxin domain (PE25 or TccC3hvr) were shown to trigger cell death of human colon carcinoma cells HCT116 expressing EGFR *in vitro*, and to reduce the growth of HCT116 tumors *in vivo*, after subcutaneous implantation in immunodeficient (athymic Nude) mice.

In this work, we aim to develop SIEC-X strains targeting mouse tumors that could be tested in immunocompetent mouse models. To this end, we have developed SIEC-X strains with SAs binding Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) antigen expressed in different types of mouse tumors: bladder, melanoma, colon. In addition, we have developed a bicistronic cargo module coinjecting the two ART-toxin domains by the same bacterium. We will show recent *in vitro* data demonstrating on various mouse tumor cell lines the efficacy of these novel SIEC-X strains for adhesion to PD-L1+ cells and coinjection of PE25 and TccC3hvr ART-toxins.

Funding:

European Union's Horizon 2020 Grant Agreement #965018.



Role of HWE/HISKA2 Histidine Kinases in the General Stress Response of *Sphingopyxis granuli* TFA

Alberto Pires-Acosta, Ángela Rey-Hidalgo, Inmaculada García-Romero, Francisca Reyes-Ramírez

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo(CABD/CSIC), Junta de Andalucía, Universidad Pablo de Olavide (UPO), Sevilla

apiraco@alu.upo.es

In their natural habitat, bacteria face constantly changing conditions, and responding to them properly is essential for their survival. One of these responses is the General Stress Response (GSR) that offers the cell cross-protection to different unrelated stresses. GSR regulation is very precise and, in Alphaproteobacteria, depends on three main components: an ECF σ -factor (EcfG), an anti- σ factor (NepR), an anti-anti- σ factor (PhyR). The activation of this system is triggered when a histidine kinase (HK) of the HWE/HISKA2 family phosphorylates PhyR which by a mechanism known as sigma factor mimicry allows the capture of NepR, subsequently releasing EcfG for the expression of genes under GSR regulation [1].

Sphingopyxis granuli strain TFA is an Alphaproteobacteria with the capability to grow using the recalcitrant organic solvent tetralin as a carbon and energy source [2]. TFA contain two paralogues of EcfG, NepR and PhyR and the role of each one has been described in previous works by our group. TFA is the only described Alphaproteobacteria where the paralogues of PhyR: PhyR1 and PhyR2 are specialized in signaling different kinds of stresses, but the mechanisms that led to their phosphorylation are still unknown [3].

The genome of TFA contains four HKs of the HWE/HISKA2 family: SGRAN_1165, SGRAN_1773, SGRAN_2544 and SGRAN_3483. In this work, we aim to determine the specific role each one plays in GSR activation. Therefore, we have constructed single, double, and triple in frame deletion mutants of the four genes encoding these HKs in order to characterize their stress response phenotype under different environmental stresses (desiccation, osmotic, heavy metals and oxidative stress). We have also quantified GSR activation in exponential (non-stress) and stationary phase (stress) of these mutants using *lacZ* translational fusions of the GSR regulated gene *nepR2*.

Our results have led us to propose SGRAN_3483 as the main HK activator of the GSR cascade in the stresses tested. On the other hand, the SGRAN_1165 mutant strains produce smaller colonies than the WT strain. This growth deficiency may be caused by an overactivation of the GSR cascade as has been suggested in other cases [4].

- [1] R. de Dios, E. Santero, and F. Reyes-Ramírez. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/IJMS22083900.
- [2] B. Floriano, E. Santero, and F. Reyes-Ramírez. *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/GENES10050339.
- [3] R. de Dios, E. Santero, and F. Reyes-Ramírez. *Environ. Microbiol.*, vol. 24, no. 4, p. 1918, Apr. 2022, doi: 10.1111/1462-2920.15907.
- [4] L. Gottschlich, M. Bortfeld-Miller, C. Gäbelein, S. Dintner, and J. A. Vorholt, . *PLoS Genet.*, vol. 14, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1007294.

Acknowledgments: This work has been supported by the Grant PID2021-125491NB-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades / Agencia Estatal de Investigación), and by FEDER, EU to FR-R.



A search for BARs: engineering outer membrane proteins toward the development of Bacterial Antigen Receptors in *E. coli*

Alejandro Prieto Durán, Álvaro Ceballos-Munuera and Luis Ángel Fernández

Department of Microbial Biotechnology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Madrid 28049, Spain.

alejandro.prieto@cnb.csic.es

Synthetic biology has allowed the development of diagnostic and therapeutic bacteria based on optimal chassis containing genetic modules providing diagnostic and therapeutic functionalities. In our laboratory, we aim to develop synthetic bacterial receptors expressed on the surface of *E. coli* able to bind to an extracellular macromolecular antigen (e.g., proteins, polysaccharides) and produce an output signal in response. Expression of these type of Bacterial Antigen Receptors (BARs) would have enormous applications in synthetic biology, in the generation of output signals and biosensors responding to the presence of diverse antigens from pathogens, tumors, disease biomarkers, etc. In this work, we summarize our current work toward the generation of a BAR enabling detection of a tumor-associated antigen, the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), by *E. coli* bacteria.

To design a BAR in the outer membrane (OM) of *E. coli* we proposed to engineer members of the intimin/invasin/autotransporter protein family for which we had previous evidence of their capacity to display single domain antibodies (nanobodies) on the bacterial surface for ligand binding (Salema *et al.*, 2013, Salema and Fernández, 2017). Hence, we fused a nanobody with capacity to bind EGFR to the β -barrels of intimin, invasin, and EhaA autotransporter, and investigated on the potential of these chimeras to anchor a protein signaling domain in the periplasm of *E. coli*. We have demonstrated that these OM chimeras showed good levels of nanobody display and antigen binding when fusing both small peptides and larger polypeptides in the periplasmic side. As a proof-of-concept for a BAR, we chose the split fragments of the Nanoluc luciferase reporter enzyme (Small-Bit and Large-Bit). In this way, dimerization of the OM BAR sensors due to ligand binding should lead to the assembly of a functional enzyme from split protein fragments of Nanoluc, which in turn could generate a detectable bioluminescence output signal. Current data showing the detection of EGFR by *E. coli* bacteria having these BARs will be presented.

References:

Salema, V. *et al.* (2013) Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of *E. coli* cells with two β -domains of opposite topologies, *PLoS ONE* **8**: e75126.

Salema, V. and Fernández, L. (2017). *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies, *Microb Biotechnol* **10**: 1468-1484.

Funding:

Programa Juan de la Cierva-formación 2021. Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2021-2023. Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

European Union's Horizon 2020 Grant Agreement #965018.



Heterogeneidad fenotípica en el superintegrón de *Vibrio cholerae*

Amalia Prieto Nieto^{1,2}, Alberto Hipólito^{1,2}, Filipa Trigo Da Roza^{1,2}, Ester Vergara^{1,2}, Lucía García-Pastor^{1,2}, José Antonio Escudero^{1,2}.

MBA lab, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria UCM

¹ Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

² VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

amaliapr@ucm.es

Vibrio cholerae, el agente causante del cólera, posee en su segundo cromosoma una región de 126 kb conocida como el *Superintegrón* (SI), una plataforma genética que capta, almacena y modula la expresión de genes que están codificados en pequeños elementos móviles denominados *cassettes*. La integrasa del SI es la proteína responsable de la integración y escisión de los *cassettes*, y su expresión está regulada por la respuesta SOS. Así, en ausencia de estrés, su expresión está bloqueada por la unión de LexA a una secuencia adyacente al P_{int} .

En este trabajo hemos estudiado a nivel de células individuales la expresión de la integrasa del SI de *V. cholerae*. Usando un reportero GFP y citometría, hemos detectado heterogeneidad fenotípica en un 0.3-0.5% de la población, que expresa la integrasa de manera significativa en ausencia de estrés. Esto da lugar a la formación de subpoblaciones P_{int}^{ON} y P_{int}^{OFF} . En mutantes *lexA_{ind}*, en los que la respuesta SOS está inactiva, la población P_{int}^{ON} desaparece, sugiriendo que la heterogeneidad es dependiente de la respuesta SOS. Para probar que los niveles de expresión de la integrasa son biológicamente relevantes en la subpoblación P_{int}^{ON} , hemos desarrollado un reportero de recombinación en el que la actividad de la integrasa reconstituye un marcador de resistencia. Los ensayos de recombinación confirman que la expresión de la integrasa en la subpoblación P_{int}^{ON} es suficiente para ser funcional y dependiente de la respuesta SOS. Para determinar si estos resultados son extrapolables a otros integrones cromosómicos hemos sintetizado y analizado las regiones P_{int} de 5 especies de *Vibrio* diferentes. En la actualidad estamos analizando la relación de la heterogeneidad en la transferencia horizontal de genes usando mutantes de los sistemas de defensa a plásmidos DdmABC y DdmDE.

Nuestros resultados tienen importantes implicaciones en el rol de los integrones en la adaptación bacteriana. Es sabido que los integrones generan adaptación a demanda en presencia de estrés, pero aquí demostramos que también generan variabilidad genética en su ausencia, lo que representa una estrategia de pre-adaptación y *bet hedging*.



Regulación del ensamblaje de flagelos polares en *Pseudomonas putida*

Marta Pulido-Sánchez¹, Antonio Leal-Morales¹, Aroa López-Sánchez¹, Felipe Cava² and Fernando Govantes¹

¹ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Junta de Andalucía and Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

² The Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå Center for Microbial Research (UCMR), Science for Life Laboratory (SciLifeLab), Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå, Suecia

mpulsan@upo.es

Pseudomonas putida es una bacteria Gram-negativa no patógena colonizadora de la rizosfera que utiliza un penacho de entre 3-6 flagelos unipolares para desplazarse. Durante cada ciclo celular, los componentes estructurales del flagelo se ensamblan secuencialmente en el polo celular no flagelado para asegurar la movilidad en ambas células hijas tras la siguiente división. En este trabajo mostramos que la acción coordinada de las proteínas FimV, FliH y FliN controla la localización y número de flagelos en *P. putida*, así como el comienzo de su síntesis durante el ciclo celular.

Mediante marcaje fluorescente, hemos establecido la jerarquía de ensamblaje de las proteínas flagelares FliH>FliI>FliM>FliC, comenzando con el reclutamiento de FliH en el nuevo polo poco después de la división celular, y terminando con la polimerización de los filamentos de FliC coincidente con la siguiente división celular. FliH restringe el reclutamiento de las proteínas estructurales del flagelo específicamente al polo celular, previniendo la acumulación de intermediarios flagelares en lugares ectópicos. FliH es además necesario para el ensamblaje del sistema de secreción tipo III flagelar que exporta los componentes extracelulares del flagelo, y el factor anti- σ FlgM que reprime al factor de transcripción flagelar FliA, permitiendo así la transcripción de los genes flagelares tardíos. FliN regula el número de flagelos limitando la acumulación de FliH y las proteínas estructurales del flagelo en los polos celulares, gracias a su papel represor de la transcripción [1] y mediante un segundo mecanismo postranscripcional. El reclutamiento polar de FliN es estrictamente dependiente de FimV, quien además estabiliza la asociación de FliH al polo celular. FimV y FliN regulan el momento en que se inicia el ensamblaje flagelar, previniendo el reclutamiento prematuro de proteínas estructurales al nuevo polo.

Proponemos que una señal ligada a la división celular desencadena el reclutamiento de un complejo FimV-FliH-FliN que asegura el ensamblaje de un número adecuado de flagelos en el sitio correcto y el momento oportuno en las bacterias con flagelación polar.

[1] Leal-Morales A, Pulido-Sánchez M, López-Sánchez A, Govantes F. Transcriptional organization and regulation of the *Pseudomonas putida* flagellar system. *Environ Microbiol.* 2022 Jan;24(1):137-157. doi: 10.1111/1462-2920.15857



Bases moleculares de la amplificación adaptativa del gen de la carbapenemasa NDM-1

Mario Pulido-Vadillo, Jose F Delgado-Blas, Carlos Serna, Javier F Favieres, Bosco R Matamoros, Natalia Montero, Bruno Gonzalez-Zorn

Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

mpulid02@ucm.es

Las carbapenemasas son los mecanismos de resistencia a antibióticos más preocupantes para la Salud Pública. Entre ellas, la carbapenemasa NDM-1 es una de las más relevantes por su prevalencia mundial, y su facilidad para la movilización entre diferentes estructuras genéticas y hospedadores por transferencia horizontal.

En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares que rigen la dinámica del gen *bla*_{NDM-1} en un entorno genético característico, frecuente y ecológicamente exitoso. Utilizamos como modelo una cepa de *Escherichia coli* MG1655 con el plásmido silvestre pCW-NDM-1, identificado en un trabajo previo del grupo en diferentes enterobacterias de aguas residuales de Ghana (1). Este plásmido presenta varias unidades de 9 kb repetidas en tándem formadas por el gen *bla*_{NDM-1} flanqueado por regiones homólogas que incluyen el elemento ISCR1. Estas secuencias codifican una transposasa putativa perteneciente a una familia caracterizada por su transposición replicativa.

Se realizaron diferentes experimentos evolutivos en medio líquido para evaluar la capacidad adaptativa y la reversibilidad de la amplificación del número de copias de esta región genética en respuesta a los cambios en las condiciones de evolución, y la consecuencia de la amplificación en el fenotipo de resistencia a carbapenemas. Además, se diseñaron y utilizaron diferentes mutantes de delección tanto de estructuras genéticas potencialmente responsables de la amplificación del gen en el plásmido, como de genes cromosómicos que regulan la dinámica genética bacteriana.

En cada una de las poblaciones evolucionadas, se evaluó el nivel de resistencia a meropenem, y el número de copias de *bla*_{NDM-1} en el plásmido por PCR en tiempo real (RT-PCR). Además, en algunos casos y condiciones concretas, se realizaron técnicas moleculares clásicas (*Southern-Blot*) y de secuenciación masiva (*Nanopore*) para estudiar en detalle la localización genética de las copias.

Los resultados revelaron la capacidad adaptativa de amplificación estable de un elevado número de copias del gen *bla*_{NDM-1} asociado a un fenotipo de hiperresistencia a carbapenemas. Además, el conocimiento de la dinámica molecular de esta amplificación es clave para entender las rutas de diseminación horizontal de este gen, cuya expansión amenaza la efectividad de muchos antibióticos de último recurso necesarios en medicina humana.

1. Delgado-Blas JF, Valenzuela Agüi C, Marin Rodriguez E, Serna C, Montero N, Saba CKS, Gonzalez-Zorn B. Dissemination Routes of Carbapenem and Pan-Aminoglycoside Resistance Mechanisms in Hospital and Urban Wastewater Canalizations of Ghana. *mSystems*. 2022 Feb 22;7(1):e0101921.

Esta comunicación es parte del proyecto PLEC2023-010275 (BIOTEGANIA), financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/.



Regulación y actividad de un Sistema de Secreción Tipo VI codificado en un plásmido conjugativo

María del Mar Quiñonero-Coronel¹, Sheila González-Gutierrez¹, Fernando de la Cruz¹, Eric Cascales² and M. Pilar Garcillán-Barcia¹

¹*Institute of Biomedicine and Biotechnology of Cantabria (University of Cantabria-CSIC), Santander, Spain*

²*Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM, UMR 7255), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), Aix Marseille Univ, CNRS, Marseille, France.*

quinoneromm@unican.es

El Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS) es un complejo multiproteico presente en bacterias Gram-negativas que permite inyectar efectores de una manera dependiente de contacto a otras células, tanto procariotas como eucariotas. Su papel es crítico en la competición en comunidades microbianas y en la patogenicidad. El T6SS está principalmente codificado en cromosomas, aunque existen también asociados a determinadas Unidades Taxonómicas Plasmídicas. La funcionalidad de los T6SS codificados en plásmidos está escasamente probada. En este trabajo, nos centramos en el mecanismo de regulación y actividad de un T6SS codificado en un plásmido conjugativo de *Enterobacterales*. Mediante experimentos con reporteros de fluorescencia en diferentes contextos genéticos se identificó un regulador negativo y otro positivo, H-NS y SlyA, respectivamente. El papel de estos reguladores se correlaciona tanto a nivel de expresión génica (RNA-Seq), como con el ensamblaje del T6SS, cuyas dinámicas han sido estudiadas mediante microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo. Además, se evaluó la toxicidad de dos posibles efectores, con sus correspondientes proteínas de inmunidad, en células bacterianas y levaduras, siendo estas últimas susceptibles a uno de ellos. En resumen, este estudio presenta el primer T6SS activo codificado en un plásmido conjugativo, el cual tiene actividad antieucariótica.

Financiación:

Ministerio de Universidades (FPU20/04579); EMBO Scientific Exchange Grant (10617); Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto MCIN/AEI/10.13039/501100011033 PID2020-117923GB-I00)



Copy number analysis reveals a universal scaling law governing plasmid biology

Paula Ramiro-Martínez¹, Ignacio de Quinto Cáceres¹, João Alves Gama¹ and Jerónimo Rodríguez-Beltrán^{1,2}

¹ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, Madrid, Spain

² CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

paularamiromartinez@gmail.com

Plasmids —autonomously replicating DNA molecules that stably coexist with the chromosome— readily transfer between individual cells and are one of the main drivers of horizontal gene transfer across bacterial phylogeny. Plasmids might be restricted to a single species, or they can trespass phylogenetic boundaries and be present in different bacterial families, genera, and even phyla. Plasmids are as diverse as their hosts, showing a vast range of replication and mobility types, genetic repertoire, including antibiotic and virulence resistance genes, G+C content, and size. While most of these plasmid factors have been extensively characterized, plasmid copy number (PCN) remains relatively understudied.

Here, we explored DNA sequencing data from different studies and databases to estimate the PCN for more than 6800 different plasmids belonging to more than 95 bacterial species from both gram-positive and negative bacteria. These plasmids belonged to more than 245 distinct replicon types and 95 plasmid taxonomic units (PTUs), indicating the astounding diversity of plasmid types. Our results show that PCN is highly variable, ranging from ~1 copy to more than 500 copies per cell, and that PCN is generally conserved across hosts of different species and genera, indicating that PCN is an idiosyncratic property of plasmids. Although antibiotic resistance genes (ARGs) are more abundant on low PCN plasmids, we detected that specific ARGs, such as certain beta-lactamases, are strongly associated with higher PCNs. Moreover, our data uncovers an unexpected negative relationship between plasmid size and PCN that holds across the bacterial phylogeny. Strikingly, this correlation suggests that despite huge variability in plasmid sizes and PCNs, the total DNA per plasmid is constant and proportional to chromosome size in all bacterial species analyzed. In other words, independently of plasmid replication type or size, any given plasmid comprises ~2.7% of the cellular nucleotide pool. Altogether, our results provide the first large-scale description of PCNs across plasmid types while uncovering a universal scaling law that governs plasmid biology.



Comparación de efectores de la familia NEL de ligasas de ubiquitina de *Salmonella*

Andrea Bullones Bolaños, Paula Martín Muñoz, Claudia Vallejo Grijalba, Joaquín Bernal Bayard, Francisco Ramos Morales

Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

framos@us.es

Salmonella enterica serovar Typhimurium expresa dos sistemas de secreción de tipo III, T3SS1 y T3SS2, codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI1) y SPI2, respectivamente. Se trata de dispositivos moleculares esenciales para la virulencia que secretan más de 40 proteínas efectoras que se translocan a las células del animal hospedador. Este estudio se centra en tres de estas proteínas efectoras, SlrP, SspH1 y SspH2, que son miembros de la familia NEL de ligasas de ubiquitina E3. Comparamos sus patrones de expresión, regulación y translocación, su papel en la invasión celular y la proliferación intracelular, su capacidad para interactuar con proteínas específicas del hospedador y para ubiquitilarlas y su efecto sobre la secreción de citoquinas. Hemos descubierto que la transcripción de los tres genes que codifican estos efectores depende del regulador de virulencia PhoP. Aunque los tres efectores tienen el potencial de ser secretados a través de T3SS1 y T3SS2, la secreción de SspH1 y SspH2 está restringida en gran medida a T3SS2 debido a su patrón de expresión. Detectamos un papel de estos efectores en la proliferación dentro de los fibroblastos que queda enmascarado por la redundancia entre ellos. La generación de proteínas quiméricas nos permitió demostrar que la región N-terminal de estas proteínas, que contiene los motivos de repetición ricos en leucina, confiere especificidad hacia las dianas de ubiquitilación. Además, observamos patrones de poliubiquitilación diferentes para cada efector, con predominio de los enlaces a través de Lys48 para SspH1 y SspH2. Por último, nuestros experimentos apoyan el papel antiinflamatorio de SspH1 y SspH2.

Agradecimientos: Proyecto PID2022-136863NB-I00 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto PID2019-106132RB-I00 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/ 501100011033. Proyecto P20_00576 financiado por FEDER y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía. Proyecto US-1380805 financiado por Universidad de Sevilla, FEDER and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía.



Cross-regulation and signal interference between two Two-Component Systems of *Lactocaseibacillus paracasei* BL23 involved in the response to antimicrobial peptides

Manolo Zúñiga¹, Cristina Alcántara¹, Thorsten Mascher², and [Ainhoa Revilla-Guarinos](#)^{3*}

¹Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, España; ²Department of General Microbiology, Institute für Mikrobiologie, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany; ³Departamento Genómica y Salud, Fundación FISABIO, Valencia, España.

ainhoa.revilla@fisabio.es

Background: Bacterial Two-Component Systems (TCS) specifically connect external stimulus with appropriate cellular responses ensuring the microorganism survival. Molecular and structural recognition mechanisms guarantee the specificity of the interactions between partner proteins¹. Rarely, cross-regulation, *i.e.*, “communication between distinct signaling pathways that provides a physiological benefit to the organism”, and cross-talk, *i.e.*, “detrimental communication between two different signaling pathways” might happen².

Within the Bce-like systems, BceRS-like TCS appear genetically and functionally associated with the BceAB-like ABC transporters. *L. paracasei* BL23 possesses two Bce-like systems: the TCS PsdRS and ApsRS are associated with the PsdAB and ApsAB transporters, respectively. PsdRSAB and ApsARSB constitute functional units, which are involved in the response to antimicrobial peptides (AMPs)³. A third orphan ABC transporter, DerAB, is present. Absence of a functional DerAB increased the sensitivity to defensins, which unraveled its biological function as an AMP resistance system. Remarkably, it also resulted in hyperresistance against the lantibiotic nisin but not to the closely related subtilin.

Objective: to comprehensively investigate the Bce-systems-mediated signaling response of *L. paracasei* BL23 against the lantibiotics nisin and subtilin.

Methods: creation of mutant strains; MIC determinations; qRT-PCR to analyze the response against nisin and subtilin; bacterial two-hybrid analysis of the interactions of non-partner proteins; production of His-tagged response regulators; biolayer interferometry assays.

Results: (i) Nonproductive signaling interference due to cross-talk between DerAB transporter and PsdRS TCS results in a diminished response of the PsdRSAB system to nisin *in vivo*. In Δ *derB* the signaling interference is removed and the full signaling potential within the Psd system is released, hence there is an increased activation of *psdAB* expression that results in nisin hyperresistance⁴. (ii) The Psd system might indeed cross-regulate the Aps-target genes, involved in maintenance of critical cell membrane functions, at least in the absence of ApsRSAB⁵.

Importance: AMPs are considered as new alternatives to classical antibiotics. We need to remain vigilant for the development of antimicrobial resistances upon the prolonged clinical use of AMPs. Gain-of-function mutations in regulatory circuits could be selected upon repeated exposition to the antimicrobials, which could unmask the hidden potential in the response of the Bce-like systems to certain AMPs.

References:

- 1 Laub, M. T. *et al.* (2007). doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.170548:1
- 2 Capra, E. J. *et al.* (2012). 10.1146/annurev-micro-092611-150039:1
- 3 Revilla-Guarinos, A. *et al.* (2013). 10.1128/AEM.00178-13:1
- 4 Revilla-Guarinos, A. *et al.* (2020). 10.1128/AEM.00818-20:1
- 5 Zhang, Q. *et al.* (2024). 10.1038/s41598-024-53592-1:1

Funding: A.R-G. is funded by the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 101026278, project SMILES.



Functional Metagenomic for discovery of novel enzymes of industrial and environmental interest

Valentín Ángel Limón Sarabia, Irene Párraga Borrell, Eva María Camacho Fernández, Francisca Reyes-Ramírez.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD/CSIC); Junta de Andalucía; Universidad Pablo de Olavide (UPO). Sevilla

fregram@upo.es

It is estimated that less than one percentage of microorganisms are culturable under standard laboratory conditions and amenable to traditional experimental studies. This involves that we are losing an enormous amount of genetic information and its potential application, representing a serious obstacle for finding new enzymes.

Functional Metagenomics permit access to the totality of microbial genomes in an environmental sample by direct DNA extraction, without requiring cultivation of the microorganisms. Also, it allows to identify new genes whose sequence is radically different from those known sequences. Functional Metagenomics involves extraction of DNA from a particular environment, construction of a library with metagenomic DNA, expression of the library in a microbial host and screening for activity in an enzymatic assay or o growth on selective media.

In this project we have employed functional metagenomics to search genes encoding enzymatic activities of industrial and environmental interest. This includes the utilization of lignocellulosic waste to discover new enzymes that are more efficient in degrading lignocellulosic polymers, as well as in degrading plastic materials like PET (polyethylene terephthalate) and PUR (polyurethane).

In this study, we utilized a previous constructed metagenomic library derived from DNA extracted from a pristine soil sample obtained from Los Alcornocales Natural Park in Cádiz, Spain. This library consists of 185,000 clones which were transferred into specialised *Escherichia coli* strains optimized for heterologous gene expression of metagenomic DNA [1,2]. We developed agar plate-based screening methods to identify both cellulases (endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases) and enzymes able to hydrolyse the ester bonds in PET and PUR. For the detection of non-secreted activities, the *E. coli* host also include an anhydrotetracycline inducible cell lysis system based on the lambda phage lysis system. This system allows lysis of most cells from colonies grown on solid media upon addition of the inducer but allows recovery of survivors from those colonies that have screened positive [3]. The results of these functional screening are presented here.

- [1]. Terrón-González L., Medina C., Limón-Mortés M, Santero E. Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci Rep* **3**, 1107 (2013).
- [2]. Terrón-González L., Martín-Cabello G., Ferrer M. Santero E. Functional Metagenomics of a Biostimulated Petroleum-Contaminated Soil Reveals an Extraordinary Diversity of Extradiol Dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* **82**, 2467-2478 (2016).
- [3]. Cárcel-Márquez J, Flores A, Martín-Cabello G, Santero E, Camacho EM. Development of an inducible lytic system for functional metagenomic screening. *Sci Rep* **9**, 3887 (2019)

Acknowledgments: This work has been supported by the Grant TED2021-132239B-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by NextGenerationEU/PRTR to FR-R and EMC.



Control of mutation rate by a *nucS* antisense RNA in *Mycobacterium tuberculosis*

Ruiz-Enamorado, A, Moreno, R, Blazquez, J

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

angel.ruiz@cnb.csic.es

The mismatch repair system (MMR) mainly corrects mispaired bases that arise because of replication errors. The canonical MMR system, based on MutS/MutL proteins, assures low mutation rates and its expression is tightly controlled. At a post-transcriptional level, *mutS* mRNA is negatively regulated by a trans-encoded small RNA (sRNA) in a RpoS dependent manner. Under stress conditions, the amounts of MutS decrease, thereby increasing the mutation rate to enhance the generation of adaptative mutations.

The *mutS/mutL* genes are highly conserved except in Actinobacteria (including *Mycobacterium tuberculosis*) and several groups of Archaea, which have a non-canonical MMR system with NucS as a key protein. NucS corrects mispaired bases that lead to transitions. However, little is known about how *nucS* expression is regulated. A recent transcriptomic study showed the possible presence of an antisense sRNA complementary to *nucS* mRNA, which appeared to be differentially expressed under nitrosative stress. This sRNA could be regulating *nucS* under stress conditions, enhancing the gain of adaptative mutations, a phenomenon of particular significance in *M. tuberculosis* which solely acquires antibiotic resistance through chromosomal mutations.

In this work, the mentioned sRNA was detected by retrotranscription coupled to conventional PCR, and its differential expression after nitrosative stress induction was confirmed. Transcriptional fusions to a fluorescence reporter gene allowed detecting a promoter from which the sRNA is transcribed. Our results suggest that this sRNA is a negative regulator of *nucS* since mutation rates increase when it is overexpressed. Additionally, expression of the sRNA is induced by isoniazide, a crucial antibiotic for tuberculosis treatment.



La Dieta Afecta A La Efectividad Del Trasplante Fecal Como Terapia Frente A Patógenos Multirresistentes

Ángel Ruiz-Moreno¹, Beatriz Herrera¹, Anna Quirant¹, María José Garzón¹, Antonio Pineda-Lucena^{2,3}, Nuria Gómez-Cebrián², Leonor Puchades-Carrasco², Carles Úbeda^{1,4}

1. Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana - FISABIO, Valencia, España
2. Drug Discovery Unit, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España
3. Molecular Therapeutics Program, Centro de Investigación Médica Aplicada, University of Navarra, Pamplona, España
4. Centers of Biomedical Research Network (CIBER) in Epidemiology and Public Health, Madrid, España

angel.ruiz@fisabio.es

Los patógenos resistentes a antibióticos (PRAs) son un problema sanitario fundamental. La infección por PRAs, como los Enterococos vancomicina-resistentes (ERV) y las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), frecuentemente comienza por la colonización del intestino, un paso clave que en condiciones de homeostasis es impedido por la microbiota intestinal. Alteraciones en la microbiota inducidas por antibióticos permiten a PRAs colonizar y persistir en el intestino. Por ello se han comenzado a utilizar terapias basadas en la restauración de la microbiota (i.e. trasplante fecal) con el fin de disminuir la colonización por este tipo de patógenos. Este novedoso tratamiento, aunque prometedor, presenta una gran variabilidad en la tasa de erradicación de PRAs. Además, se desconocen las causas/factores que afectan a la eficacia del trasplante fecal. En este estudio, utilizando un modelo de ratón, hemos demostrado que la dieta del donante es un factor clave en la eficacia del trasplante fecal como terapia frente a PRAs. Para ello, se simuló una situación clínica, tratando a ratones con vancomicina, lo que permite la colonización por ERV o ERC. Con el fin de reestablecer la microbiota y eliminar al patógeno, se realizó un trasplante fecal de ratones alimentados con dieta control (CD-TF) o una dieta occidental rica en grasas y azúcares simples (DO-TF). La dieta del donante influyó en la reconstitución de la microbiota lo que produjo diferencias significativas en la descolonización intestinal de los PRAs, siendo el trasplante CD-TF significativamente más efectivo. Experimentos ex vivo junto con análisis metranscriptómicos y metabolómicos sugirieron que mecanismos directos por los cuales las bacterias de la microbiota inhiben a ERV (i.e. competición por nutrientes, producción de sustancias inhibitorias) están involucrados en el impacto de la dieta en la eficacia del trasplante fecal. Nuestro estudio indica que la dieta del donante debería ser un factor a tener en cuenta en la utilización del trasplante fecal como terapia frente a patógenos multirresistentes.

Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España:

MolPathoGut - PID2020-120292RB-I00



Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus spp*

Samara Sabsabi, Patricia Bernabé-Quispe, Marina Costa, M^a del Pilar Marin, Irene Cruz, Amparo Valentín, Juan Frasseto y M^a Ángeles Tormo-Mas

Instituto de investigación Sanitaria La Fe

samara_sabsabi@iislafe.es

Staphylococcus spp son un grupo de bacterias de gran relevancia clínica que causan una amplia variedad de infecciones tales como infecciones de la piel, endocarditis, neumonía y sepsis, entre otras. Actualmente, la adquisición de genes relacionados con la resistencia a los antibióticos por parte de estas bacterias, así como su capacidad para formar biofilm, supone un alto riesgo para la sanidad y requiere del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de infecciones. La terapia fágica representa un enfoque innovador en el tratamiento de infecciones bacterianas por la capacidad natural de los bacteriófagos para infectar y destruir bacterias específicas. Además, la elevada especificidad de los fagos en su actividad antimicrobiana, destruyendo selectivamente las cepas bacterianas objetivo sin afectar a la microbiota normal, representa una ventaja significativa sobre los antibióticos convencionales.

En este trabajo, se aislaron y caracterizaron fagos líticos para el tratamiento de infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus lugdunensis* multirresistentes a antibióticos. Estos fagos fueron obtenidos y aislados a partir de muestras ambientales y residuales de diversas procedencias.

Para la caracterización de cada fago, se realizó una evaluación de su rango de hospedador frente a una serie de cepas clínicas de cada especie, se observó su morfología mediante microscopía electrónica y se secuenció su genoma, a partir del cual se realizó un análisis *in silico* para asegurar la ausencia de genes de virulencia, de toxinas o genes relacionados con la lisogenia, y del mismo modo, se realizó genómico comparativo de los diferentes fagos. De los fagos obtenidos, se seleccionaron aquellos que presentaban las características más óptimas para su posible uso en fagoterapia y se evaluó su capacidad de eliminar el biofilm.

El uso de bacteriófagos como tratamiento de infecciones se considera una de las vías más prometedoras frente a la aparición de bacterias multirresistentes y a la falta de nuevos antibióticos efectivos.

Financiación: Proyecto PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto AICO/2021/306 financiado por la Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital de la Generalitat Valenciana.



Desarrollo de un algoritmo para la identificación y caracterización del excludoma de genomas bacterianos

Alvaro San Martín¹, Pablo Iturbe-Sanz¹, Jerónimo Rodríguez-Beltrán², Iñigo Lasa¹

¹Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain.

²Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS); Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

alvaro.sanmartin.bernal@navarra.es

La implementación de métodos de secuenciación masiva de RNA para determinar el perfil transcriptómico de las bacterias ha puesto de manifiesto que con mucha frecuencia los transcritos de genes vecinos solapan en sus regiones 5' o 3' no traducidas (5' y 3' UTRs) sugiriendo la existencia de un mecanismo para coordinar su expresión (1). Esta idea dio lugar al concepto de "excludón" que consiste en genes vecinos que solapan su expresión de tal modo que la expresión de uno de ellos excluye la expresión del otro gen, bien por interferencia transcripcional o digestión por la RNaseIII (3). La determinación de los excludones presentes en el genoma de una bacteria requiere disponer de datos transcriptómicos cadena específicos y realizar un análisis manual para identificar las zonas de solapamiento. En este trabajo presentamos el desarrollo de una herramienta bioinformática para identificar de forma objetiva el conjunto de excludones presentes en el genoma de una bacteria (Excludoma) a partir de los datos transcriptómicos.

Como prueba de concepto para probar la herramienta hemos utilizado datos de análisis transcriptómicos realizados para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* disponibles en el NCBI. Nuestros resultados indican la existencia de al menos 40 y 30 excludones que afectan a la región 5' UTR de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. En relación con los excludones en la región 3' UTR identificamos la existencia de al menos 200 y 40 en *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Para validar los resultados obtenidos hemos realizado un análisis de transcriptomas realizados a nivel de célula individual, bajo la premisa de que los genes vecinos podrán expresarse simultáneamente si no forman parte de un excludón, mientras que genes vecinos que formen un excludón no deberían expresar simultáneamente. Los resultados obtenidos son coherentes con nuestra hipótesis. En su conjunto, los resultados obtenidos apoyan la existencia de un mecanismo de coordinación de la expresión génica entre genes vecinos que implica la existencia de una relación funcional entre los mismos, que hasta ahora ha pasado desapercibida.

1. Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, Mozos IR de los, Vergara-Irigaray M, Segura V, Fagegaltier D, Penadés JR, Valle J, Solano C, Gingeras TR. 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc National Acad Sci* 108:20172–20177.

3. Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., and Cossart, P. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat Rev Microbiol* 11, 75–82. 10.1038/nrmicro2934.



Dissecting pOXA-48 fitness effects in clinical enterobacteria using plasmid-wide CRISPRi screens

Álvaro Barrera-Martín, Jorge Sastre-Domínguez, Coloma Costas, Álvaro San Millán y Alicia Calvo-Villamañan

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

alicia.calvovillamanan@cnb.csic.es

The main nosocomial mechanism for the acquisition of antimicrobial resistance (AMR) is horizontal gene transfer mediated by plasmids. Although plasmids can spread easily between different hosts, specific successful associations of plasmid-bacteria emerge. Such is the case for the major antibiotic resistance plasmid pOXA-48, a plasmid associated with carbapenem-resistant Enterobacteria, one of the major AMR threats to public health. Interestingly, pOXA-48 has been shown to produce vastly different fitness effects in different Enterobacteria hosts. Although plasmid-host interactions are a known multifactorial phenomenon, the molecular basis behind them remain poorly understood. Here, we aim at analysing the associations of pOXA-48 with several clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains in an integrative way. To this end, we studied the fitness effects associated with individually silencing every gene in pOXA-48 using plasmid-wide CRISPRi screens in a collection of 12 clinical strains. Our results showed that although pOXA-48 leads to radically different fitness effects on different clinical strains, the fitness effects of pOXA-48-encoded genes follow similar trends in the different clinical hosts. Specifically, the expression of the carbapenem-resistance gene *bla*_{OXA-48} was the main responsible for plasmid-associated fitness costs across the different strains. Moreover, we revealed that PemK-PemI toxin-antitoxin system plays a key role in pOXA-48 stability in the populations through vertically transmission. In this study we validate the function of known genes and reveal previously unknown functions, highlighting the utility of using this type of set-up for studying clinical strains.



La metilación del DNA en bacterias tiene un papel en el control de la susceptibilidad a antibióticos

Rocío Fernández-Fernández¹, Francine Amaral-Piubeli², Hervé Nicoloff³, Dan I. Andersson³ & María Antonia Sánchez-Romero¹

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

² Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

³ Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Infections and Immunity, Uppsala University

mtsanchez@us.es

Las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos suponen una gran amenaza para la salud humana en todo el mundo. Por lo tanto, urge la necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas que puedan solucionar este problema mundial.

La investigación clásica sobre la resistencia a los antibióticos ha intentado comprender cómo las mutaciones espontáneas en determinados genes diana o sus reguladores permiten a las bacterias adquirir resistencia a los antibióticos y cómo el intercambio de elementos genéticos móviles entre bacterias permite la transferencia horizontal de genes que contribuye a la propagación de los determinantes de resistencia. Sin embargo, los cambios en la secuencia del DNA no pueden explicar totalmente ni la velocidad de desarrollo de la resistencia a los antibióticos ni la existencia de resistencia transitoria. Por lo tanto, la idea de que los mecanismos epigenéticos podrían estar contribuyendo a la resistencia a los antibióticos es cada vez más relevante.

Nosotros hemos explorado si la metilación del DNA en bacterias tiene un papel en el control de la susceptibilidad a los antibióticos utilizando 414 aislados clínicos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos. Estos aislados fueron secuenciados por Illumina y Oxford Nanopore Technology con el objetivo de analizar sus modificaciones genéticas y epigenéticas. La susceptibilidad a diversos antibióticos, así como la presencia de heteroresistencias también fue evaluada en estos aislados clínicos.

Los resultados derivados de este estudio muestran un patrón interesante en la frecuencia de metilasas entre los aislados clínicos resistentes comparado con aislados no resistentes, así como una relación entre patrones de metilación y susceptibilidad a algunos antibióticos. Por lo tanto, la metilación del DNA parece tener un papel relevante en la resistencia a antibióticos y podría inspirar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



Sabotaging *Mycobacterium tuberculosis* virulence with a Transcription Factor Genetic Trap

Laura Sanz-Asensio, Estefanía Crespo-Yuste, Juan Calvet-Seral, Jesús Gonzalo-Asensio*

Grupo de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza

l.sanz@unizar.es

*Correspondence to: jagonzal@unizar.es

Tuberculosis (TB) is an infectious disease whose main causal agent in humans is *Mycobacterium tuberculosis*. Historically, TB has killed more people than any other infectious disease. Nowadays, it continues to be a major public health concern in many countries. Given the high number of drug-resistant TB cases, alternative strategies to fight this disease are under investigation. In this context, antivirulence approaches, which focus on disarming pathogens by neutralizing their virulence factors, represent a promising strategy.

The PhoPR Two-Component System (TCS) is key for the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Since the PhoP protein acts as a transcription factor, the aim of this project was to develop a Transcription Factor Genetic Trap (TFGT) to prevent PhoP binding to its putative promoters in the genome, thus rendering the PhoPR TCS inactive. To this end, a replicative plasmid containing 12 repetitions of 5 well-known, high-affinity PhoP promoters in *M. tuberculosis* (*pks2*, *lipF*, *mcr7*, *mihF*, *pks3*) was constructed in order to trap PhoP and named “PhoP mini-chromosome”.

The PhoP mini-chromosome plasmid was transformed into *Mycobacterium smegmatis*, a non-pathogenic surrogate of *M. tuberculosis*, as a proof of concept to demonstrate the TFGT performance. The effect of the trapping plasmid over the PhoPR regulon of *M. smegmatis* was checked by qRT-PCR. These results showed the expected changes in the expression of PhoPR-regulated genes previously identified by RNA-seq (*MSMEG_0894*, *MSMEG_6294*), resembling the phenotype showed by a Δ *phoPR* knock-out. To further validate the TFGT performance, we used two reporter plasmids containing the GFP gene under the control of well-known PhoPR promoters of *M. tuberculosis* (*pks2* and *mcr7*). *M. smegmatis* harbouring each of the reporter plasmids was co-transformed with the PhoP mini-chromosome, showing a GFP fluorescence intensity similar to the Δ *phoPR* strain, and significantly different from the *wild type* strain.

Our results indicate that the TFGT strategy efficiently recruits PhoP, inactivating the PhoPR TCS. Hence, the delivery of this sabotage mechanism into pathogenic mycobacteria could represent an attractive therapeutic strategy.

Referencias:

Gonzalo-Asensio et al. (2006) PLoS one

Walters et al. (2006) Mol Microbiol

Broset et al. (2015) mBio

Solans L. et al. (2014) PLoS Pathog



Sources of stability in β -solenoid proteins: pneumococcal choline-binding modules

Beatriz Maestro^{1,2}; Miguel Saturio-Hornillos²; Jesús M. Sanz^{2,3}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense de

Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

² Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 28040 Madrid, Spain.

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud

Carlos III, 28029 Madrid, Spain

jmsanz@cib.csic.es

The β -solenoid fold is present in proteins from several bacterial species, ranging from food-related microorganisms (e.g. *Leuconostoc citreum*) to pathogens (*Clostridioides difficile*, *Streptococcus mutans* or *S. pneumoniae*). The most studied representatives of this family are the choline-binding modules (CBMs) that are part of the pneumococcal choline-binding proteins (CBPs), and that are responsible for their binding to the bacterial cell wall, where they carry out their biological function. The standard three-dimensional structure of the CBMs is based on four elements: i) β -hairpin repeats; ii) linker loops; iii) N- and C-terminal tags usually involved in dimerization or configuring a non-standard choline-binding site, and iv) aromatic residues in or near the choline binding sites (CBSs). Previous results have demonstrated that β -hairpins are robust structures able to fold autonomously, and that the loops are essential to keep β -hairpins in place. Here we have checked the importance of termini tags and of a fully conserved inner "fourth" aromatic residue in contact with other three aromatics which are directly involved in choline binding.

Protein engineering was employed to generate site-specific mutants targeting the non-standard CBSs in the C-terminal tag of the pneumococcal CbpD choline-binding module, as well as the four inner aromatics in the corresponding module of the major pneumococcal autolysin, LytA. Structure, stability and ligand affinity was assessed by circular dichroism and folding thermodynamics. As a result, all mutations generated natively folded and functional proteins but with a severe decrease in stability and in affinity for choline.

Conclusions: The β -solenoid fold of CBMs can be thought as a sort of molecular "spring" with a tendency to elasticity unless it is kept in place by terminal tags and inner aromatic residues. This flexibility may however play a biological role in the pneumococcal physiology, as it will be discussed in the communication. Moreover, our results also pave the way for the engineering and biotechnological application of β -solenoid proteins.

Funding: Grants PID2022-139209OB-C21 and PID2022-139209OB-C22 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033.



Prior steps in the reduction of cyanobacterial genomes: Toxin-Antitoxin systems as stabilization modules

Alicia Segura-Mejías^a and Rocío López-Igual^a

^aInstituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), Universidad de Sevilla and CSIC, Sevilla, Spain

alicia.segura@ibvf.csic.es

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes with great potential for biotechnology, although the genetic instability limits their application in industry. Genetic instability is often associated with the presence of mobile genetic elements (MGEs), such as plasmids and transposons. Bacteria have evolved mechanisms to stabilize these MGEs, including the toxin-antitoxin systems (TAs). Among TAs, Type II comprises of two genes organized in an operon, with both the toxin and the antitoxin being proteins: a toxin that induces cell death, and an antitoxin that neutralizes the toxic effect [1].

Our objective is to reduce the genome of *Anabaena* sp. PCC 7120, a filamentous cyanobacterium able to fix atmospheric nitrogen in specialized cells named heterocysts. *Anabaena* contains a complex genome with 6 plasmids and a large number of predicted MGEs and TAs. First, we analyzed *Anabaena* genome *in silico*, recognizing 56 predicted TAs. Then, we developed a method to analyze them in *Escherichia coli* identifying 7 different TAs. Their localization in *Anabaena* genome is: three are encoded in plasmids, and four in MGEs of chromosome, of which, two are localized into DNA elements interrupting genes that are reconstituted during heterocysts differentiation [2].

Currently, we are developing a sophisticated genetic system to construct a cyanobacteria strain without these MGE. Furthermore, we sought to determine whether TAs play a role in stabilizing MGEs. To achieve this, we initially utilized an unstable plasmid in *E. coli* [3]. However, none of them stabilize this vector, possibly because these systems have host-restricted functionality. Thus, we are currently testing TA systems functionality and their possible role as additive modules in cyanobacteria. To do this, we are using three methods: i) using an inducible promoter to test toxicity; ii) checking the activity of TA promoters; iii) constructing a system (*Anabaena* strain lacking TAs) to test the function of TAs as stabilization modules. In summary, we are generating knowledge about TAs, constructing genetic tools useful to the cyanobacterial research community, and finally advancing the construction of a photosynthetic bacterial chassis.

[1] Jurénas, *et al.* Nat Rev Microbiol (2022) doi: 10.1038/s41579-021-00661-1

[2] Hilton, *et al.* PLoS One (2016). doi: [10.1371/journal.pone.0156034](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156034)

[3] Jurénas, *et al.* MBio (2021). doi: 10.1128/mBio.02947-21.

Funding:.

- Grant PID2019-104784RJ-I00 MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spain.
- Grant RYC2021-034768-I funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and the EU "NextGenerationEU"/PRTR".
- Programa Operativo de Empleo Juvenil (marco del Fondo Social Europeo, FSE), Universidad de Sevilla (Reference: EJ5-62).
- VI Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla, 2020.
- VII Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla, 2023. Ref.: VIIPPIT-2023-II.2. y Atracción Investigadores Alto Potencial. Ref: VIIPPIT-2022



Descubriendo el amiloma intestinal: identificación y detección de amiloides en la microbiota intestinal

Miriam Serrano, Alejandro Toledo-Arana, Jaione Valle

miriam.serrano@csic.es

La microbiota del tracto gastrointestinal constituye el biofilm más abundante del cuerpo humano. Estudios recientes han reconocido que los amiloides son elementos funcionales y estructurales de la matriz extracelular del biofilm de muy diversas bacterias. Sin embargo, nuestros conocimientos actuales sobre los amiloides presentes en el biofilm de tracto gastrointestinal son limitados. Con el fin de analizar la composición del amiloma (amiloides de la microbiota intestinal), en este trabajo se han llevado a cabo dos aproximaciones experimentales.

Por un lado, se ha realizado un análisis *in silico* de la presencia de proteínas ortólogas al amiloide Bap de *Staphylococcus aureus* en bacterias de la microbiota intestinal. Se han identificado 19 proteínas BAP en el microbioma intestinal que contienen dominios con propiedades amiloides. Se ha determinado la presencia de los amiloides BAP en muestras fecales humanas utilizando un protocolo de fraccionamiento diferencial de las muestras y un ensayo de retención en membrana. La especificidad de la señal amiloide se confirmó mediante el análisis de la susceptibilidad de las muestras a los tratamientos con ácido fórmico, así como por la reactividad de las muestras BAP-positivas con anticuerpos conformacionales de especies oligoméricas de plegamiento transitorio o estructuras amiloides.

Por otro lado, se ha llevado a cabo una evaluación general de los amiloides presentes en el microbioma en disbiosis relacionada con la edad mediante el análisis del metaproteoma de la fracción insoluble purificada de la microbiota de muestras fecales humanas.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán establecer la primera base de datos de amiloides de la microbiota entérica humana que servirá como herramienta inestimable para estudiar la diversidad de amiloides de la microbiota gastrointestinal, la desviación en la composición de amiloides en condiciones de enfermedad y podrán utilizarse como plataforma de cribado de moléculas inhibitoras de amiloides.



Desarrollo y Validación de una Plataforma Microfluídica *Airway-Infection-on-a-Chip* para el Modelado de Infecciones Bacterianas Crónicas

Carlos Sobejano de la Merced¹, Marc Riera-Pons¹, Iván Cortés-Domínguez^{1,2}, Junkal-Garmendia^{3,4,5}, Carlos Ortiz-de-Solórzano^{1,6}

¹Laboratorio de Sistemas Microfisiológicos y Biología Cuantitativa, Departamento de Ingeniería Biomédica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Pamplona, España; ²Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA); ³Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC) – Gobierno de Navarra, Mutilva, España; ⁴Conexión Nanomedicina CSIC (NanomedSIC); ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, España; ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Oncológicas (CIBERONC), Madrid, España.

csobejanod@unav.es

La Organización Mundial de la Salud reconoce la resistencia a los antibióticos como un grave problema para la salud pública, particularmente acuciante en el tratamiento de enfermedades infecciosas respiratorias bacterianas. Las infecciones respiratorias crónicas por *Haemophilus influenzae* son de especial importancia en pacientes que sufren enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cuyo crecimiento formando *biofilms* facilita la resistencia antibiótica^{1,2}.

Hoy en día, no existen estrategias efectivas para estudiar la formación de *biofilms* bacterianos en las vías aéreas bajas. Los métodos empleados – crecimiento bacteriano en superficies abióticas (en estático o con aplicación de flujos), cultivos celulares 2D y modelos animales – permiten la observación de interacciones huésped-patógeno, pero carecen de relevancia fisiológica y anatómica para reproducir fielmente infecciones respiratorias crónicas.

En las últimas décadas, los sistemas *organ-on-a-chip* han emergido como modelos humanos prometedores para simular las interacciones que tienen lugar en el cuerpo humano, mejorando los sistemas actualmente empleados. En este trabajo, introducimos el sistema *airway-infection-on-a-chip*, que permite modelar infecciones bacterianas crónicas mediante la inclusión de unos reservorios destinados a la formación de *biofilm*. Estos reservorios están conectados al modelo pulmonar mediante una válvula rotatoria que permite, por una parte, realizar un cultivo independiente de bacterias y células en un mismo dispositivo, y por otra, cuando se desee, conectar ambos canales para observar las interacciones producidas entre ambas entidades biológicas. El diseño y las propiedades ópticas de este dispositivo permiten estudiar las interacciones bacteria-célula de una forma sencilla y compacta, lo cual podría ayudar en la búsqueda de nuevos tratamientos anti-biofilm. En este trabajo, se muestra el diseño conceptual y se aportan pautas prácticas para la fabricación y funcionalización de estos dispositivos. Así mismo, se ilustra el uso de este dispositivo para estudiar las interacciones que ocurren en las vías aéreas bajas, empleando *biofilms* de *H. influenzae*.

1. Bowler, P.G., *J.Wound.Care* 2018, 27
2. Marcinkiewicz, J. *et al.*, *Pol.Arch.Med.Wewn.* 2013

Agradecimientos: Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del proyecto PDI2021-122409OB-C22, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER, UE (C.O.S., I.C.D.), y PC137, financiado por Gobierno de Navarra, (C.O.S.). C.S.M. disfruta de un contrato una beca de Formación de Profesorado Universitario, FPU20/06252.



Development of an innovative intravaginal model of probiotic inoculation in dairy ovine farms: evidence of positive effects on the vaginal microbiota, vaginitis and fertility.

Marion Toquet¹, Jesús Gomis¹, Estrella Jiménez-Trigos¹, Esther Bataller¹, Marta Barba^{1,2}, Antonio Sánchez³, Pedro González-Torres^{1,4}, Ángel Gómez-Martín¹

¹Microbiological Agents Associated with Animal Reproduction (ProVaginBIO) Research Group, Departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Carrer Tirant lo Blanc, 7, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

²Agrifood Research and Technology Centre of Aragon (CITA), Calle Corinto nº3, 44159, Teruel, Spain.

³Ruminant Health Research Group, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.

⁴Microomics Systems S.L., Barcelona, Spain.

mariontoquet1@uchceu.es

In vitro studies have reported the antimicrobial effect of an inoculum (L2) made from a commercial probiotic of *Lactobacillus* spp. (60% *Lactobacillus crispatus*, 20% *L. brevis* and 20% *L. gasseri*) against some ruminants bacterial pathogens (1–3). However, the possible effects of L2, for example to control the vaginosis produced by oestrus-synchronization intravaginal sponges (IS), have not been evaluated *in vivo*.

A double dose of L2 was inoculated intravaginally in 60 ewes (P group) from two dairy commercial ovine flocks. A group of sheep remained in each flock without inoculation in a control model (C group, n = 60). The first inoculation occurred the day of IS insertion (T0) while the second dose was inoculated just after IS removal (T1). Finally, the pregnancy was diagnosed by ultrasound around day 50-60 after artificial insemination (T2) to determine the conception rate. At each sampling time point, the rectal temperature and vaginal pH were measured, and vaginal samples were taken for vaginal cytology and metagenomic analysis.

Globally, genera such as *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Streptobacillus*, *Campylobacter* or *Trueperella* were significantly more abundant ($P < 0.05$) at T1, when neutrophilia and vaginal discharges were observed, while some genera of Lactobacillales, previously reported to be beneficial for pregnancy (4), showed a significant decrease at T1 ($P < 0.01$) and increase at T2 ($P < 0.01$). The P group of the first flock showed a significant greater richness ($P < 0.05$) and presence of Lactobacillales ($P < 0.05$), and a lower abundance of *Mycoplasma* spp. ($P < 0.001$) at T2 compared to the C group. Moreover, the conception rate was 10.7% higher in the P group of the first flock than in the C group while the conception rate (over 80%) in the second flock was the same between the two experimental groups. Overall, the administration of L2 at T0 lowered the number of ewes with vaginitis by 11.13% at T1.

Our results suggest that the intravaginal use of probiotics could positively modulate the microbiota and vaginal inflammation linked to IS use with an associated improvement in fertility and animal welfare.

Acknowledgements: this work was supported by the Generalitat Valenciana (Spain) [GVA/2020/026], the Spanish Ministry of Science and Innovation [PID2020-119462RA-I00/AEI/10.13039/501100011033], the I+D+i contract between the CEU Cardenal Herrera University (CEU-UCH) of Valencia and Center for Selection and Genetic Improvement of Sheep and Goats of Castilla y León (OVIGEN), the CEU-UCH aid for Recognized Research Groups [GIR23/27] and the Consolidation of Research Indicators [INDI23/27]. Marion Toquet is supported by a pre-doctoral contract of the CEU-UCH and Ángel Gómez-Martín by a “Ramón y Cajal” contract of the Spanish Ministry of Science and Innovation [RYC2021-032245-I].

Bibliography:

1. Toquet M, Bataller E, Gomis J, Sánchez A, Toledo-Perona R, De La Fe C, et al. Front Vet Sci. 2023 Jun 22;10:1197701.
2. García-Galán A, Gómez-Martín Á, Bataller E, Gomis J, Sánchez A, Gadea J, et al.. Animals. 2020 May 13;10(5):837.
3. García-Galán A, De la Fe C, Gomis J, Bataller E, Sánchez A, Quereda JJ, et al. BMC Vet Res. 2020 Dec;16(1):251.
4. Barba M, Toquet M, García-Roselló E, Gomis J, Quereda JJ, González-Torres P, et al. Front Microbiol. 2024 Jan 11;14:1224910.



Nuevos sistemas de detección de SARS-CoV-2 basados en nanomateriales con puertas moleculares

M^a Ángeles Tormo Mas, Isabel Caballos, Alba López-Palacios, Yoel Esteve-Sánchez, Andy Hernández-Montoto, Eva Calabuig, M. Dolores Gómez-Ruiz, Elena Aznar y Ramón Martínez-Mañez

Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Grupo Infección grave. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

tormo_man@iislafe.es

La pandemia de COVID-19, ha puesto de relieve la importancia de realizar pruebas diagnósticas rápidas y rastrear a los individuos infectados como medio para mitigar la propagación del virus. Por ello, el desarrollo de métodos sensibles y rápidos para la detección de SARS-CoV-2 es crucial. En este trabajo se presentan diversos biosensores basados en nanomateriales con puertas moleculares.

El primero de consiste en un disco nanoporoso cargado con el indicador fluorescente rodamina B y recubierto con un aptámero que se une selectivamente a la proteína S de SARS-CoV-2. El sistema se evaluó inicialmente utilizando el virus de la estomatitis vesicular con diferentes proteínas S del SARS-CoV-2 en su superficie. Cuando el virus está presente, la puerta se abre selectivamente, provocando la liberación del indicador. El nanodispositivo demostró su capacidad para detectar concentraciones de pseudovirus de $7,5 \times 10^3$ PFU / mL. Además, resultó eficaz co muestras nasofaríngeas de individuos sospechosos de estar infectados con SARS-CoV-2.

El segundo biosensor utiliza oligonucleótidos específicos de la proteína nucleocápside (N). El nanosensor presentó un potencial prometedor en medios tamponados que contenían ARN sintético y ARN de SARS-CoV-2 extraído de pacientes y demostró ser altamente sensible y selectivo en tampones acuosos y en medios biológicos, mostrando un límite de detección (LOD) de 100 copias/mL. La presencia de varios fármacos comunes no interfirió en la detección, lo que pone de manifiesto su selectividad y robustez. Por último, se validó con muestras nasofaríngeas de pacientes. Dado que no se requiere pretratamiento de la muestra, este biosensor tiene un gran potencial para ser utilizado en la detección del SARS-CoV-2, ya que es más rápido y tiene una sensibilidad similar a la RT-PCR.

El último dispositivo está basado en nanomateriales recubiertos de proteínas para la detección de anticuerpos contra la proteína N. En presencia de anticuerpos contra este antígeno se detecta señal fluorescente, demostrando un LOD de 1 μ g/mL. Los ensayos de especificidad con proteínas N de otros coronavirus demuestran que el sistema es específico para el reconocimiento de anticuerpos anti-proteína N de SARS-CoV-2. Además, el funcionamiento del nanomaterial fue validado con muestras de suero de individuos con anticuerpos SARS-CoV-2.

Financiado por el Gobierno español (proyectos PID2021-126304OB-C41 y PID2021-122875OB-100 (MCUI/AEI/ FEDER, UE)), la Generalitat Valenciana (proyecto no.2 RD 180/2020, CIPROM/2021/007), Fondo Supera COVID-19 (proyecto DIACOVID), Universitat Politècnica de València-Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS-LaFe) (proyectos SARS-COV-2-SEEKER y VISION-COV).



**Interplay of *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* in coinfection:
Biofilm Dynamics and Host Immune Response**

Víctor Campo-Pérez¹, Esther Julián² and Eduard Torrents^{1,3}

¹ Bacterial Infections and Antimicrobial Therapy Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain.

² Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain.

³ Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

etorrents@ibecbarcelona.eu / esther.julian@uab.cat

The incidence of infection by nontuberculous mycobacteria, mainly *Mycobacterium abscessus*, in patients with cystic fibrosis and other chronic pulmonary illnesses is increasing, translating into an acceleration in the decline of lung function. In most cases, *M. abscessus* coinfects with *Pseudomonas aeruginosa*, the most common pathogen in these chronic diseases. However, it is unknown how these two bacterial species interact when coinfecting. This study aims to explore the behavior of both species in three relevant pathogenic settings: dual-species biofilm development using a recently developed method to monitor individual species in dual-species biofilms; coinfection in bronchial epithelial cells using in vitro assays; and in vivo coinfection using the *Galleria mellonella* model. The results demonstrate the capability of both species to form stable mixed biofilms and to reciprocally inhibit single-biofilm progression. Coinfections in bronchial epithelial cells were correlated with significantly decreased cell viability, while in *G. mellonella*, coinfections induced lower survival rates than individual infections. Outstandingly, the analysis of the immune response triggered by each bacterium in bronchial epithelial cell assays and *G. mellonella* larvae revealed that *P. aeruginosa* induces the overexpression of proinflammatory and melanization cascade responses, respectively. In contrast, *M. abscessus* and *P. aeruginosa* coinfection significantly inhibited the immune response in both models, resulting in worse consequences for the host than those generated by single *P. aeruginosa* infection. Overall, the presence of *M. abscessus* produces a decline in the immune responses that worsens the infection and compromises the host.

This study was supported by grants RTI2018-098777-B-I00, PID2021-122331OB-I00, PID2021-125801OB-100, PDC2022-133577-I00 and PLEC2022-009356 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2021SGR-0092 and 2021SGR-0145), the European Regional Development Fund (FEDER), the Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social “La Caixa”. VC-P is a recipient of a Ph.D. contract (FI) from the Generalitat de Catalunya.



***Streptococcus suis* transfiriere genes de resistencia a antibióticos
a otros estreptococos patógenos de humanos**

Cristina Uruén^{1,2}, María José Lavilla^{3,4}, Antonio Rezusta^{3,4}, Clara Marín^{3,5}, Jesús Arenas^{1,2,4*}

¹Unidad de Microbiología, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria. ²Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Zaragoza, España; ³Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España; ⁴Instituto de Salud Aragonesa, IIS. ⁵Departamento de Ciencia Animal, CITA, Zaragoza, España.

* jarenasbusto@gmail.com

S. suis es el agente causal de la enfermedad estreptocócica porcina, causando una elevada prevalencia y mortalidad a nivel mundial. Exhibe una notable diversidad genotípica, clasificándose en 33-35 serotipos y más de 3800 secuencias tipo (ST). *S. suis* ha desarrollado elevadas tasas de resistencia, especialmente a tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas. Los genes responsables de estas resistencias (GRAs) se ubican en elementos genéticos móviles (MGEs), como elementos integrativos y conjugativos (ICEs) e integrativos y movilizables (IMEs) facilitando su transferencia entre especies. Al poder colonizar al ser humano, tiene el potencial de transferir GRAs a otros patógenos.

En el estudio se investigó la transferencia de GRAs de *S. suis* a otros estreptococos patógenos humanos tanto *in vivo* como *in vitro*. Para esto se determinó el perfil de resistencias de 116 aislados invasivos de *S. suis* obtenidos de cerdos enfermos y 2.516 aislados de diferentes especies de estreptococos de pacientes humanos (*S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. mitis*), observándose altas tasas de resistencias a tetraciclinas, macrólidos y/o lincosamidas en *S. suis* (~90%) y moderadas en el resto de estreptococos (~30%). Se secuenciaron los genomas de los aislados resistentes portadores de los GRAs *tet(O)* y *erm(B)*, concretamente 30 de *S. suis* y 9 de *S. agalactiae*. Análisis bioinformáticos detectaron *tet(O)* y *erm(B)* ubicados en MGEs en ambas especies. Aunque estos MGEs mostraron similitudes, también presentaron variaciones en la organización genética y secuencia nucleotídica. Curiosamente, los MGEs de las cepas Ss_72 y Ss_124 de *S. suis* y Sa_44 de *S. agalactiae* mostraron homología nucleotídica superior al 97%, sugiriendo la transferencia *in vivo* de GRAs entre ambas especies. Posteriormente, se analizó la transferencia *in vitro* de GRAs entre especies. Cepas de *S. suis* con MGEs que portaban GRAs fueron co-incubadas con cepas de estreptococos de humana de la colección. Se obtuvieron transconjugantes con el MGE de *S. suis* integrado en su genoma en todas las mezclas, excepto en *S. mitis*. Las tasas de conjugación variaron entre especies, en parte influenciadas por mecanismos de competición interespecie. En conclusión, *S. suis* puede transferir GRAs a otros estreptococos patógenos de humanos mediante MGEs, lo cual representa un desafío para la salud global.

Este estudio fue financiado por los proyectos ABC-VaccineSs (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) concedido por la Agencia Estatal de Investigación y TRANSIT (Ref. LMP58_21) de I+D+i de la Dirección General de Aragón.



ANALYSIS OF THE *PSEUDOMONAS OGARAE* F113 SECRETOME REVEALS TWO NEW TYPE VI SECRETION SYSTEMS EFFECTORS

David Vázquez-Arias, David Durán, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla & Marta Martín.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

david.vazquez@uam.es

Pseudomonas ogarae F113 is a model rhizobacterium considered a relevant biocontrol agent because of its ability to produce a diverse set of antibacterial and antifungals compounds such as DAPG. The genome sequence of *P. ogarae* F113 encodes three copies of Type Six Secretion Systems (T6SSs; F1-, F2- and F3-), an essential bacterial nanomachine involved in interbacterial competition and rhizosphere colonization. In addition to the structural elements, another five orphan VrgG protein clusters unrelated to a specific T6SS cluster are present. An *in-silico* analysis of F113 genomic sequence revealed genes encoding eight T6SSs effectors, some of them associated with their corresponding immunity protein. All this Effector-Immunity pairs are associated either with T6SSs structural operons or with orphan VgrG proteins. We have characterised the secretoma of the wild-type strain and mutants affected in each of the T6SS structural clusters. This analysis

showed that under the conditions tested, only T6SS F-1 was functioning and allowed us to identify two potentially new effectors not detected in our previous *in silico* analysis (tfe9 and tfe10). The preliminary results revealed that Tfe9 seems to have an immunity protein and unknown function, additionally Tfe10 is orthologue to *Salmonella typhimurium* Tae4 (type VI amidase effector) without an immunity protein. Our results suggest that these effectors are necessary for the antibacterial activity of *P. ogarae* F113 against *E. coli*.

This work has been funded by Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades FEDER/EU Grant PID2021-125070OB-I00. David Vázquez Arias was granted by FPI-UAM program (SFPI/2021-00458).



rRNA synthesis during growth in *Mycobacterium tuberculosis* on different carbon sources.

Lucía Vázquez Iniesta¹, Sogol Alebouyeh¹, Jorge A. Cárdenas-Pestana², Rafael Prados-Rosales¹, Joaquin Sanz^{2,3}, M. Carmen Menéndez¹ and María J. García¹.

- 1) Department of Preventive Medicine and Public Health and Microbiology, School of Medicine, Autónoma University of Madrid, Madrid, Spain.
- 2) Department of Theoretical Physics, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
- 3) Institute BIFI for Bio-computation and Physics of Complex Systems, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

lucia.vazquez@uam.es

Latency is the most common infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), but the characteristics that the bacterium adopts during that dormant state are largely unknown [1].

This work focuses on the study of ribosome synthesis in several carbon sources, some of them mimicking dormancy, by analysing the levels of 16S rRNA and two essential mycobacterial transcriptional regulators; CarD and RbpA. In *Mtb* these regulators are able to bind to the DNA promoter on the one hand, and to RNAP on the other hand. Besides, they also participate stabilizing the open transcription complex at the PCL1 promoter-level of the *rrnA* ribosomal operon, thus increasing the transcriptional output flux. They can also intervene, either individually or simultaneously, on the same transcription initiation complex [2,3,4].

We compared conditions that include different carbon sources: dextrose, glycerol and long-chain fatty acids, as well as different iron availability (with and without iron each condition). We found that ribosomes were probably accumulated instead of being synthesized *de novo* in long stationary phase; besides, the regulator CarD was preferentially used when lipids were the carbon source.

Using this approach, we aim to understand how the environment modulate the synthesis of ribosomes, a central component of bacterial growth, when comparing active-*versus* dormant-like states of *Mtb*.

[1] Alebouyeh, S., et al. *Frontiers in Microbiology* 13 (2022)

[2] Chen, J., et al. *Nature Reviews Microbiology* 19(2), 95-109 (2021)

[3] Jensen, D., et al. *Nucleic Acids Research*, 47(13), 6685-6698 (2019)

[4] Rammohan, J et al. *Nucleic Acids Research*, 44(15), 7304-7313 (2016)

Funding sources: AES 2019 PI19-00666



rRNA processing in cyanobacteria

Cristina Velázquez-Suárez¹, Manuel Brenes-Álvarez¹, Fernando Delgado-Cháves² and Ignacio Luque¹

¹Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla, ²Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Universität Hamburg

cristina.velazquez@ibvf.csic.es

The organization of rRNA operons encoding 16S, 23S, and 5S rRNAs, along with some tRNA genes, is highly conserved in bacteria. Most species contain several copies of rRNA operons, which are thought to be necessary to achieve the high level of expression required for sustaining ribosome synthesis. In model bacteria such as *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis*, rRNA operons have been demonstrated to be transcribed as long RNAs encompassing all three rRNA genes, which are then processed through sequential cleavage by specific ribonucleases. However, this process is poorly understood in Cyanobacteria, a phylum of photosynthetic organisms. We have investigated the processing of rRNA transcripts in the cyanobacterium *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120, taking advantage of the observation that rRNA maturation is slowed down when translation is inhibited. This study was conducted using a combination of classic molecular biology techniques and next-generation sequencing approaches. This allowed us to map processing sites, identify rRNA intermediates, and develop a sequential scheme for rRNA processing. Furthermore, we have discovered that under translational stress, rRNA operons are transcribed from an inducible promoter located upstream of the main one. The inducible promoter is likely dependent on an alternative RNA polymerase sigma factor. Additionally, evidence has revealed cleavage of 23S rRNA at specific sites under particular stress conditions. The functional consequences of this cleavage are currently being investigated.

Funding

Grant PID2021-128477NB-I00, Ministerio de Ciencia e Innovación and FEDER



***Pseudomonas aeruginosa* non-essential hub proteins are implicated in virulence**

Daniel Yero^{1,2}, Oscar Conchillo-Solé^{1,2}, Joan Lluís Pons¹, Marc Bravo^{1,2}, Isidre Gibert^{1,2} and Xavier Daura^{1,3}

¹ Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

² Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), E-08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

³ Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), E-08010 Barcelona.

daniel.yero@uab.cat

Pseudomonas aeruginosa still stands out as a prominent Gram-negative opportunistic pathogen and a leading cause of multidrug-resistant infections acquired in healthcare settings. Efforts to combat these microorganisms involve persistent research from different approaches to fully discover all their pathogenicity and resistance determinants. This study started with the identification of 24 non-essential core proteins in the *P. aeruginosa* protein-protein interaction network. These proteins were shortlisted based on: (i) their presence and conservation in different Gram-negative opportunistic organisms, (ii) act as a hub in the protein-protein interaction network, and (iii) have proven to be non-essential from previous experimental works. Mutants in selected proteins in the reference strain PAO1 were evaluated for different virulence-associated phenotypes. Proteins PurM (phosphoribosylaminoimidazole synthetase) and HupB (DNA-binding protein HU-beta) were prioritized for further study since the corresponding mutant strains were shown to be less virulent in the *Caenorhabditis elegans* infection model. First, the role of PurM in *de novo* purine nucleotide biosynthesis was demonstrated by growing the PAO1 mutant strain $\Delta purM$ in minimal medium supplemented with adenine. Mutant $\Delta purM$ also showed impaired pyoverdine and pyocyanin production. On the other hand, mutant $\Delta hupB$ showed greater susceptibility to the antibiotic ciprofloxacin and its ability to form biofilm, pigment production, and swarming motility was also affected depending on the culture conditions. The pleiotropic phenotypes caused by mutation in *purM* or *hupB* genes in *P. aeruginosa* were also studied at the transcriptomic level. Both proteins affect gene expression globally and RNA-seq data showed that a total of 1,326 (415 up and 911 down) and 1,009 (483 up and 526 down) differentially expressed genes were found in the mutants $\Delta purM$ and $\Delta hupB$ respectively. In both mutants, functional classification of these genes showed enrichment in the categories of energy production and conversion, lipid and amino acid transport and metabolism. Specific operons stand out for being equally deregulated in both mutants such as those related to energy production linked to fatty acid synthesis, branched-chain amino or keto acid metabolism, and secretion of intermediates for pyocyanin biosynthesis. The selection of non-essential targets and central nodes of both the interactome and the transcriptome could pave the way for new antimicrobial strategies.



Antagonistic interactions between phage and host factors control arbitrium lysis-lysogeny decision

Zamora-Caballero Sara, Cora Chmielowska , Nuria Quiles-Puchalt, Aisling Brady, Francisca Gallego Del Sol, Javier Mancheño-Bonillo, Alonso Felipe-Ruíz, Wilfried J J Meijer, José R Penadés, Alberto Marina.

szamora@ibv.csic.es

Phages can use a small-molecule communication system known as arbitrium to coordinate lysis-lysogeny decisions. Although originally described in phages of the SPbeta group, the arbitrium system is widespread in Bacillota and can also be found in conjugative elements and plasmids. In the phi3T phage, the arbitrium system has been described to consist of three main components, all encoded in the phage genome. AimP, the small signaling peptide, is secreted into the medium after phage infection and is internalized by surrounding bacteria. The sensor, AimR, is a transcription factor that in the absence of AimP promotes the expression of aimX, a non-coding RNA that exerts a negative regulatory effect on lysogeny by an unknown mechanism. When the host:phage ratio is high during initial stages of the phage infection, AimP peptide concentration is low, aimX is transcribed and the lytic cycle is favoured. Accumulation of the peptide allows the phage to switch to lysogeny when the susceptible bacterial population is reduced, which allows safe persistence of both the integrated prophage and the bacterial host. AimP binds to AimR, inactivating its function and therefore inhibiting the expression of aimX, which results in promoting lysogeny. However, the molecular details of this mechanism remained elusive. We have determined that the arbitrium system in *Bacillus subtilis* phage phi3T modulates the bacterial toxin-antitoxin system MazE-MazF to regulate the phage life cycle. We show that in phi3T AimX is functions as a protein and not as a non-coding RNA as postulated before. AimX, together with YosL bind to and inactivate MazF. AimX also inhibits the function of phi3T_93, a protein that promotes lysogeny by binding to MazE and releasing MazF. Overall, these mutually exclusive interactions promote the lytic cycle of the phage. After several rounds of infection, the phage-encoded AimP peptide accumulates intracellularly and inactivates the phage antiterminator AimR, a process that eliminates aimX expression from the aimP promoter. Therefore, when AimP increases, MazF activity promotes reversion back to lysogeny, since AimX is absent. Altogether, our study reveals the evolutionary strategy used by arbitrium to control lysis-lysogeny by domesticating and fine-tuning a phage-defence mechanism.



Regulación de promotores flagelares de Clase II activados por FleQ en *Pseudomonas putida*

María Zapata-Cruz, Aroa López-Sánchez & Fernando Govantes

Nombre del Centro o Institución: Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD),
Universidad Pablo de Olavide (UPO)

mzapcru@acu.upo.es

El factor de transcripción FleQ es el principal regulador del cambio de estilo de vida en la bacteria gram negativa *Pseudomonas putida*. Es un activador de la familia de NtrC que regula tanto la producción de flagelos, asociada al estilo de vida unicelular libre o etapa planctónica, como la producción de exopolisacáridos y proteínas de adhesión, relacionada con el estilo de vida sésil durante la cual se desarrollan comunidades bacterianas asociadas a superficies conocidas como biofilms.

El trabajo previo de nuestro laboratorio ha llevado a la identificación de doce promotores flagelares de Clase II, activados directamente por FleQ. Estos promotores dirigen la transcripción de operones que codifican todos los componentes del cuerpo basal flagelar y el gancho, así como varios elementos reguladores. Todos los promotores flagelares activados por FleQ son dependientes de σ^{54} y la activación es antagonizada por di-GMPc y FleN. Las secuencias consenso propuestas para los sitios de unión de FleQ están altamente conservadas en los promotores regulados por FleQ relacionados con la formación de biofilm, pero rara vez se encuentran buenas coincidencias en los promotores flagelares y, cuando aparecen, su ubicación no es compatible con el mecanismo de activación desde sitios distantes que es intrínseco a los promotores dependientes de σ^{54} .

En este trabajo, hemos caracterizado la unión de FleQ al promotor flagelar de Clase II *PflgB* mediante ensayos de unión proteína-ADN *in vitro* (EMSA) usando FleQ purificada y tanto la versión silvestre como versiones mutantes de esta región promotora. Además, hemos realizado ensayos de actividad β -galactosidasa para comprobar el efecto de estas mutaciones en la expresión de este promotor flagelar. Todos estos resultados en conjunto nos han permitido identificar los sitios más relevantes de unión de FleQ al promotor *PflgB*.



A biotechnological tool to detect integron cassettes

Filipa Trigo da Roza^{1,2}, André Carvalho^{1,2}, Paula Blanco^{1,2}, Ester Vergara^{1,2}, Modesto Redrejo³, Melanie Blokesch⁴ & José Antonio Escudero^{1,2}

¹ Molecular Basis of Adaptation, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

² VISAVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³ Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

⁴ UPBLO, Global Health Institute, School of Life Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

filipatr@ucm.es

Integrons are genetic elements that capture and rearrange gene cassettes, including those encoding antimicrobial resistance (AR)¹. They have played a central role in the spread of multidrug resistance, recruiting >170 different AR genes². However, detecting integron cassettes remains challenging, as conventional methods such as PCR are often biased, and deep sequencing is still not practical for routine analysis.

Here, we sought to develop a novel biotechnological tool to identify, for the first time, integron cassettes independently of their genetic sequence and background.

We have re-designed an integron to act as a capture platform by embedding an integration site within two counter-selectable markers: *ccdB* and *sacB*. The rationale is that incoming cassettes disrupt *ccdB* or *sacB*, allowing bacteria to survive in “killing” conditions, thus providing a readout for recombinant selection. Before selection, growth in “survival” conditions ensures bacterium viability. The escape mutant rate of this tool is low: 10^{-6} in most conditions, providing a broad range to detect cassettes.

As a preliminary verification, we show that both counter-selectable markers report cassette capture in a classical conjugation/recombination assay³. Then, using these markers and plasmid/chromosomal locations, we developed a tool amenable to 3 distinct uses.

First, we used a chromosomal version to develop a conjugation-sentinel *E. coli* that can detect cassettes from incoming natural plasmids when co-cultured with a plasmid donor.

Second, we used a plasmid version of the tool to capture cassettes from large chromosomal integrons and produce cassette libraries. This tool captured cassettes from *Vibrio cholerae* superintegron with a recombination frequency of 10^{-3} , yielding 10^5 colonies per assay. As proof of concept, we sequenced 79 clones and found 61 cassettes from the superintegron.

Third, we implemented the tool in the naturally competent bacterium *Vibrio cholerae* to capture cassettes directly from exogenous DNA. Using a genetically modified strain and a DNA enrichment step, we were able to detect cassettes at frequencies around 10^{-5} .

We have demonstrated that this tool unveils the integron content of samples in a highly specific and sequence-independent manner. This is a ground-breaking detection method amenable to diagnostic purposes and to studying the functions encoded in large chromosomal integrons.

References

¹ Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A., & Mazel, D. (2015). The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiology spectrum*, 3(2), MDNA3–2014.

² Hipólito, A., García-Pastor, L., Vergara, E., Jové, T. & Escudero, J. A. (2023). Profile and resistance levels of 136 integron resistance genes. *npj Antimicrob Resist* 1, 13.

³ Bouvier, M., Demarre, G., & Mazel, D. (2005). Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single-strand substrate. *The EMBO journal*, 24(24), 4356–4367.



Plasmid-encoded insertion sequences promote rapid adaptation in clinical enterobacteria

Jorge Sastre-Dominquez¹, Javier DelaFuente¹, Laura Toribio-Celestino¹, Cristina Herencias^{2,3}, Pedro Herrador-Gómez¹, Coloma Costas¹, Marta Hernández-García^{2,3}, Rafael Cantón^{2,3}, Jerónimo Rodríguez-Beltrán^{2,3}, Alfonso Santos-Lopez^{*1,4}, Alvaro San Millan^{*1,4}

1. Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).
2. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal-Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain.
3. Centro de Investigación Biológica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.
4. Centro de Investigación Biológica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III.

* These authors have contributed equally. To whom correspondence should be addressed:

alfonsosantos2.as@gmail.com

asanmillan@cnb.csic.es

Plasmids are extrachromosomal genetic elements commonly found in bacteria. Plasmids are known to fuel bacterial evolution through horizontal gene transfer (HGT), but recent analyses indicate that they can also promote intragenomic adaptations. However, the role of plasmids as catalysts of bacterial evolution beyond HGT remains poorly explored. In this study, we investigate the impact of a widespread conjugative plasmid, pOXA-48, on the evolution of various multidrug-resistant clinical enterobacteria. Combining experimental and within-patient evolution analyses, we unveil that plasmid pOXA-48 promotes bacterial evolution through the transposition of plasmid-encoded insertion sequence 1 (IS1) elements. Specifically, IS1-mediated gene inactivations expedite the adaptation rate of clinical strains in vitro and foster within-patient adaptation in the gut microbiota. We decipher the mechanism underlying the plasmid-mediated surge in IS1 transposition, revealing a negative feedback loop regulated by the genomic copy number of IS1. Given the overrepresentation of IS elements in bacterial plasmids, our findings propose that plasmid-mediated IS transposition represents a crucial mechanism for swift bacterial adaptation.



A High-Throughput Microtiter Plate Screening Assay to Quantify and Differentiate Species in Dual-Species Biofilms

Víctor Campo-Pérez^{1,3}, Júlia Alcàcer-Almansa^{1,3}, Esther Julián², Eduard Torrents^{1,3}

1 Bacterial Infections and Antimicrobial Therapies Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Baldori Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain.

2 Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain.

3 Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028 Barcelona, Spain.

julialcacer@gmail.com

Pathogenic bacteria form biofilms during infection, and polymicrobial biofilms are the most frequent manifestation. Biofilm attachment, maturation, and/or antibiotic sensitivity are mainly evaluated with microtiter plate assays, in which bacteria are stained to enable the quantification of the biomass by optical absorbance or fluorescence emission. However, using these methods to distinguish different species in dual-species or polymicrobial biofilms is currently impossible. Colony-forming unit counts from homogenized dual-species biofilms on selective agar medium allow species differentiation but are time-consuming for a high-throughput screening. Thus, reliable, feasible, and fast methods are urgently needed to study the behavior of polymicrobial and dual-species communities. This study shows that *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains expressing specific fluorescent or bioluminescent proteins permit the more efficient study of dual-species biofilms compared to other methods that rely on measuring the total biomass. Combining fluorescence and bioluminescence measurements allows an independent analysis of the different microbial species within the biofilm, indicating the degree of presence of each one over time during a dual-species biofilm growth. The quantitative strategies developed in this work are reproducible and recommended for dual-species biofilm studies with high-throughput microtiter plate approaches using strains that can constitutively express fluorescent or bioluminescent proteins.

This study was partially supported by grants PID2021-125801OB-100, PLEC2022-009356 and PDC2022-133577-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2021SGR01545), the European Regional Development Fund (FEDER) and Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social “La Caixa”. J.A-A. is thankful to MCIN for its financial support through a PRE2021-098703 grant funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and co-funded by the ESF+.



Efectos de la microbiota intestinal del mosquito tigre (*Aedes aegypti*) en la resistencia a la colonización por bacterias de interés para el control de enfermedades transmitidas por vectores

Pol Nadal-Jimenez, Eva Heinz, Grant L. Hughes
Liverpool School of Tropical Medicine
pol.nadal@lstmed.ac.uk

Las enfermedades transmitidas por vectores son responsables de 700,000 muertes anuales con el mayor número de muertes teniendo lugar en países en vías de desarrollo¹. Una mayor movilidad entre países y un incremento exponencial en las últimas décadas en el transporte de mercancías ha facilitado el establecimiento en Europa de especies de mosquitos invasoras como el mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*). Estos mosquitos son capaces de transmitir enfermedades graves como las causadas por los virus del dengue, Zika, Chikungunya y fiebre amarilla. En países de Europa del sur el número de casos de dengue contraídos de forma autóctona (infecciones a personas que no han viajado a zonas de riesgo o no se han movido del país) fue de 66 en 2022 y 122 en 2023, afectando a Francia, España e Italia². En este contexto, la búsqueda de nuevos métodos de control biológico es de suma importancia. En los últimos años se han documentado una serie de bacterias presentes en la microbiota intestinal de los mosquitos, incluyendo *Aedes* spp., que son capaces de bloquear o aumentar las infecciones virales y del parásito responsable de la malaria³⁻⁶ en mosquitos. En este estudio nos hemos concentrado en analizar las interacciones negativas hacia miembros del género *Serratia*, una bacteria común en medios acuáticos que habitualmente se encuentra en el intestino de la mayoría de los mosquitos hematófagos y que en *Aedes* spp. aumenta la infección por el virus del dengue⁴. Nuestro análisis reveló que las bacterias del género *Enterobacter* son capaces de inhibir a las del género *Serratia* reduciendo *in vitro* la población de *Serratia* alrededor de un 90% en tan solo 24h. Actualmente estamos analizando los mecanismos genéticos que *Enterobacter* usa para inhibir a *Serratia* para ver como influyen en la colonización de *Aedes aegypti*. Estamos usando en paralelo modelos de *Ae. aegypti* con su microbiota natural y sistemas gnotobióticos para demostrar el impacto de *Enterobacter in vivo* en la colonización y transmisión vertical de *Serratia* spp. Los resultados de este estudio quieren contribuir al establecimiento de *Enterobacter* como un modelo eficiente para realizar paratransgénesis en mosquitos del género *Aedes*.

Referencias:

- 1 Wilder-Smith, A. *Essential Travel Medicine* 65–73 (2015)
- 2 Brem, J. *et al. New Microbes and New Infections* 56, (2024)
- 3 Gao, H. *et al. Nat. Microbiol.* 6, 806–817 (2021)
- 4 Wu, P. *et al. Cell Host Microbe* 25, 101-112.e5 (2019)
- 5 Huang, W. *et al. Science* 381, 533–540 (2023)
- 6 Bian, G. *et al. Science* 340, 748–751 (2013)

Agradecimientos:

BBSRC/NSF por apoyo financiero a través del proyecto BB/V011278/1



Characterization of K2-ST66 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains (hvKp), a rare sublineage among the hvKp pathotype

Domingo Fernández Vecilla^a, Jorge Rodríguez Grande^b, Nuria Fraile Valcárcel^b, Daniela Vallejo Iriarte^d, Pedro Bustamante de la Escalera^d, Jorge Calvo Montes^b and Alain Ocampo Sosa^{bc}.

a) Microbiology Service. Sierrallana Hospital. Torrelavega, Cantabria (Spain); b) Microbiology Service. University Hospital Marqués de Valdecilla. Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL). Santander, Cantabria (Spain); c) CIBERINFEC, Health Institute Carlos III, Madrid (Spain); d) University of Cantabria, Santander (Spain).

alain.ocampo@scsalud.es

Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) is an emerging pathotype of great concern nowadays. K2 serotype is one of the most common identified K-types among hvKp and presents a high clonal diversity. ST-66 sublineage have been rarely described so far since its discovery in 1935. We characterize here the first two K2-ST66 strains isolated in our hospital.

The strains were isolated from clinical specimens of patients with pneumonia. The strains were typed as K2-ST66 using Kaptive 2.0 database and the BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella>). Both strains harbored a chromosomal phospholipase D family protein and different mobile genetic elements (MGE) such as IncFIA(HI1) and IncFIB(K) plasmids, and an ICEKp10. These MGEs carried *clb* and *ybt* gene clusters, *rmpA/rmpA2*, *iucABCD*, *iutA* and *iroBCDN* genes. Additionally, a third plasmid with a length of 3 kb was also found in both strains. *fosA6*, *oqxA*, *oqxB4* were the only antimicrobial-related genes found in both strains. SNPs analysis revealed that strains from California [1] were genetically different from the others reported, differing by more than 800 SNPs.

Strains belonging to ST66 are rare worldwide, indeed, this is the second report describing this sublineage in Spain. Thirteen K2-ST66 strains have been described so far including the strains from this study, and up to nine of them (n=9/13) caused upper/lower respiratory tract, ear and/or eye infections. Different virulence profiles could influence tropism for different anatomical sites, as suggested by these findings. While most features are shared among all K2-ST66 strains, the IncFIB(K) plasmid could be considered as a differentiating factor among them. The IncFIB(K) plasmid presents a 40 kb insertion in some strains (120 kb versus 160 kb), which carries genes involved in the conjugation machinery (Figure 1). Half of the previously reported strains have this insertion [1-4], whereas the other strains lack it. Despite the susceptibility of these strains to antibiotics, infections caused by these strains are difficult to treat due to their high virulence profile. This research provides valuable insights by characterizing these newly isolated strains. The findings highlight the challenges for further research to develop effective treatment strategies against hvKp strains.

References

1. Kamau E, Ranson EL, Tsan AT, Bergmann-Leitner ES, Garner OB, Yang S. Front Microbiol. 2022 Oct 14;13:1001169. doi: 10.3389/fmicb.2022.1001169.
2. Rodrigues C, d'Humières C, Papin G, Passet V, Ruppé E, Brisse S. Microb Genom. 2020 Aug;6(8):mgen000419. doi: 10.1099/mgen.0.000419.
3. Klaper K, Wendt S, Lübbert C, Lippmann N, Pfeifer Y, Werner G. Microorganisms. 2021 Jan 8;9(1):133. doi: 10.3390/microorganisms9010133.
4. Fernández Vecilla D, Unzaga Barañano MJ, Sáenz Aguirre M, Pérez Vázquez M. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2023;41(2):134-136. doi:10.1016/j.eimce.2022.11.019.



Genomics of the wheat seed microbiome

Irene Sanz-Puente¹, Santiago Redondo-Salvo¹, Arancha Peñil-Celis¹, Jorge Rodriguez Grande², Alain Ocampo Sosa^{2,3}, Fernando de la Cruz¹; Marta Robledo¹

¹ Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (Universidad de Cantabria-CSIC), Santander (Spain)

² Microbiology Service. University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL. Santander, Cantabria (Spain)

³ CIBERINFEC, Health Institute Carlos III, Madrid (Spain).

marta.robledo@unican.es

Plant-associated microorganisms are known to impact plant health and disease. The endophytic microbiota is intimately associated with host plants and dwells in different plant tissues, including seeds. Surface-disinfected seeds have long been considered free of microorganisms. However, recent studies corroborate the existence of an endophytic community and its importance for plant development. Therefore, this communication focuses on the seed microbiome of wheat, a daily-consumed cereal which production is ever increasing. Our previous metataxonomic analysis of seeds from different wheat varieties originally harvested in different geographic locations demonstrated the existence of a conserved endophytic core microbiome.

Here, we characterized the wheat seed culturable microbiome at genomic level. For that, we isolated the most abundant bacteria present in surface-sterilized seeds from the ancestral diploid species *Triticum monococcum* and tetraploid *T. durum*, together with hexaploidy *T. spelta* and commercial *T. aestivum* cultivated in North Spain. Next, to exclude a bias in sample location, we extended our set by including additional seed samples from the IPK germplasm bank. The new seed material included grains from the diploid species *Aegilops tauchii* and tetraploid *T. dicoccum*, together with further ancestral and commercial seeds collected in countries belonging to five continents. We sequenced more than 100 isolates belonging to core taxa members by Illumina and Nanopore technologies. Together with strain sequences already present in the databases, we carried out a comparative and functional genome analysis. Our results shed light on the distribution, specialization and evolution of this long-term bacteria-host-associated interaction that persists over generations.



Atacando la diseminación de resistencias antimicrobianas: bacteriófagos específicos contra plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador

Yelina Ortiz¹, Maite Muniesa², Fernando de la Cruz¹ y Raúl Fernández-López¹

- (1) Departamento de Microbiología y Genómica, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria-CSIC, Santander. E-mail: yelina.ortiz@unican.es
- (2) Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona.
ortizy@unican.es

Los genes de resistencia a antimicrobianos están frecuentemente codificados en elementos genéticos móviles como son los plásmidos conjugativos. El pilus de estos plásmidos constituye el receptor específico de algunos bacteriófagos. De esta forma, los bacteriófagos dependientes de plásmidos podrían ser usados como una terapia alternativa para reducir el uso de antibióticos. La industria avícola es uno de los focos donde se necesita actuar para reducir la diseminación de patógenos zoonóticos multirresistentes, tales como *Salmonella* y *E. coli*, en aves de corral y los productos alimentarios derivados. En este trabajo se han identificado cuatro bacteriófagos de dsDNA pertenecientes al género *Alphatectivirus*, denominados PR8, PR9, PR14 y PR20 capaces de infectar específicamente cepas con plásmidos conjugativos. Estos bacteriófagos muestran una fuerte capacidad lítica frente a bacterias que contienen plásmidos multirresistentes de muy amplio rango de hospedador, pertenecientes a los grupos PTU-P1 y PTU-N1, tales como pRL443 y pKM101, respectivamente. Además, presentan una menor actividad lítica frente a plásmidos pertenecientes al grupo PTU-W, tales como R388. El uso de combinaciones de estos y otros bacteriófagos específicos de plásmidos puede ser una terapia adecuada para eliminar bacterias multirresistentes de la microbiota.

Financiación: esta publicación es parte del proyecto PCI2021-122067-2A, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y Unión Europea "NextGenerationEU"/PRTR".



El moviloma confinado de la familia *Erwiniaceae*

Santiago Redondo-Salvo, Irene Sanz-Puente, Marta Robledo, M. Pilar Garcillán-Barcia, Fernando de la Cruz

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria – CSIC, Santander, España

santiago.redondo@unican.es

El concepto de Unidad Taxonómica Plasmídica (PTU) nos permite evaluar la diversidad de los plásmidos y sus especializaciones en diferentes hospedadores para llegar a entender su papel en la adaptación bacteriana a diferentes nichos. Aquí comparamos el plasmidoma de dos familias taxonómicas del Orden Enterobacterales que presentan diferentes especializaciones ecológicas: *Erwiniaceae* y *Enterobacteriaceae*. La primera comprende simbioses de insectos y bacterias asociadas a plantas, mientras que la segunda es prevalente en intestinos. El plasmidoma de ambas familias presenta escaso solapamiento: solo 19 de los 255 plásmidos de *Erwiniaceae* circula también en *Enterobacteriaceae*. Estos plásmidos pertenecen a 12 PTUs que no son específicas de ninguna de las dos familias, sino que se distribuyen en varias familias taxonómicas. La mayor parte de las PTUs de *Erwiniaceae* no son transmisibles por conjugación (55%, comprendiendo el 87% de los plásmidos asignados a una PTU), mientras que sí lo son el 61% de las PTUs hospedadas en *Enterobacteriaceae* (81% de los plásmidos). En congruencia, la distribución de rango de hospedador en *Erwiniaceae* está sesgado hacia la presencia de las PTUs fundamentalmente en una única especie (32% de las PTUs, 64% de los plásmidos asignados a una PTU) con especializaciones en el genoma esencial y el pangenoma de estas PTUs, mientras que el 65% de las PTUs de *Enterobacteriaceae* (correspondiente al 82% de los plásmidos asignados a una PTU) circulan en distintos géneros de la familia o en rangos taxonómicos superiores. El proteoma específico de los plásmidos de *Erwiniaceae* está enriquecido en genes que participan en la biosíntesis de tiazol, glicosil transferasa, carboxilasa dependiente de piridoxal fosfato y malato:quinona oxidoreductasa y comparte solo un 7,3% de familias proteicas con el de *Enterobacteriaceae*, fundamentalmente asociadas a reguladores, transportadores y enzimas metabólicas. Todos estos datos sugieren que el plasmidoma circulante en *Erwiniaceae* está altamente especializado en esta familia taxonómica.

Financiación: Proyecto CPP2022-009595 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea-Next GenerationEU/PRTR; Proyecto PID2020-117923GB-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033



Análisis de la implicación del sistema de señalización mediado por c-di-GMP en la resistencia de *Salmonella* a la bilis

Laura Imedio, Leire Azparren, Carmen Gil-Puig y Cristina Solano

Unidad de Patogénesis Microbiana , Navarrabiomed-Universidad Pública de Navarra (UPNA)- Hospital Universitario de Navarra (HUN), IdiSNA, Irunlarrea 3, Pamplona, 31008 Navarra

laura.imedio@unavarra.es

El nucleótido cíclico c-di-GMP es un importante mensajero secundario bacteriano, cuya síntesis y degradación es catalizada por proteínas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE), respectivamente. Hoy en día sabemos que el sistema de transducción de señal mediado por c-di-GMP transduce estímulos extracelulares en respuestas celulares, controlando así una amplia gama de procesos biológicos, incluidos la movilidad, la formación de biofilm, el progreso del ciclo celular y la virulencia.

Salmonella enterica es un patógeno con un ciclo de vida complejo, pudiendo sobrevivir y multiplicarse en numerosos ambientes gracias a su capacidad de responder a una gran variedad de señales ambientales. Esta capacidad depende en buena parte del sistema de transducción de señal mediado por c-di-GMP. Un factor adverso al que se enfrenta este patógeno, tanto en el intestino como en la vesícula biliar, es la presencia de bilis. *Salmonella* no sólo es capaz de resistir a la bilis sino que además puede formar biofilms sobre la superficie de cálculos biliares, estableciéndose así un estado de portador.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo hemos analizado la implicación del sistema de señalización mediado por c-di-GMP en la resistencia de *Salmonella* a la bilis, realizando ensayos de sensibilidad al desoxicolato de sodio (DOC), la sal biliar más abundante en la bilis. Los resultados han mostrado que una cepa mutante múltiple en los doce genes que codifican proteínas con posible actividad DGC, y por lo tanto incapaz de sintetizar c-di-GMP, es extremadamente sensible al DOC. El estudio de la implicación de cada una de estas doce proteínas en la resistencia al DOC nos ha permitido identificar a dos de ellas como responsables de dicha resistencia. Contrariamente a lo esperado, el mecanismo de resistencia es independiente al metabolismo del c-di-GMP. En la actualidad, estamos realizando experimentos de selección de mutantes espontáneos que recuperan la resistencia al DOC con el objetivo de dilucidar el mecanismo de resistencia a la bilis mediado por estas dos proteínas pertenecientes al sistema de señalización mediado por c-di-GMP.

Financiación: Proyecto PID2021-127420NB-I00 financiado por MCIN/ AEI / 10.13039/501100011033 / FEDER, UE. L.A. es beneficiaria de una Ayuda del Programa de Formación de Profesorado Universitario referencia: FPU22/02023.