



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



PROGRAMA DE
DOCTORADO
BIOTECNOLOGÍA
AVANZADA



Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea

V JORNADA DE SEGUIMIENTO DEL PROGRAMA DE DOCTORADO BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

LIBRO DE RESÚMENES
Viernes 24 de mayo de 2024



© UMA Editorial. Universidad de Málaga

Bulevar Louis Pasteur, 30 (Campus de Teatinos) - 29071 Málaga
www.umaeditorial.uma.es

© Los autores

Diseño y maquetación: Los autores

ISBN: 978-84-1335-374-6



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - (cc-by-nc):

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es>

Esta licencia permite a los reutilizadores distribuir, remezclar, adaptar y desarrollar el material en cualquier medio o formato únicamente con fines no comerciales y siempre que se otorgue la atribución al creador.



Organizadores

Dr. Luis Rodríguez Moreno. Profesor Titular de Universidad.
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología.

Dr. Jose Rufián Plaza. Profesor Ayudante Doctor.
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología.

Dr. Manuel Cifuentes Rueda. Catedrático de Universidad.
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología. (Coordinador Programa de Doctorado Biotecnología Avanzada)

Entidades Organizadoras

Escuela de Doctorado. Universidad de Málaga.

Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea
“La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC).





Comité evaluador

Todas las presentaciones han sido evaluadas por un comité científico de profesores del programa de doctorado, sin que hubiera conflicto de intereses originados por ser directores o tutores de ninguno de los participantes. Este comité estuvo formado en esta edición por:

José Manuel Matés Sánchez (Catedrático de Universidad)

Tahía Fernández Duarte (Profesora Titular de Universidad)

David Posé Padilla (Profesor Titular de Universidad)

M. Dolores López Ávalos (Profesora Titular de Universidad)

Enrique Moriones Alonso (Profesor de Investigación, CSIC)



Programa detallado:

9:00 - 9:15 Bienvenida y presentación de la Jornada

Intervención de D. Salvador Pérez Moreno (Director de la Escuela de Doctorado, UMA), D^a. Carmen Beuzón López (Vicedirectora del IHSM) y D. Manuel Cifuentes Rueda (Coordinador del Programa de Doctorado).

9:15 - 11:15 Presentaciones orales (10 min + 5 preguntas)

9:15 **Verónica Pérez Rubio**: “Characterizing viral determinants and mechanisms that determine Tomato leaf curl New Delhi virus host range”

9:30 **Gemma Sans Coll**: “Characterization of the translational landscape of the plant-virus interaction”

9:45 **María García Lezama**: “Regulación genética del Desarrollo del Tegumento del Óvulo en una Angiosperma de Divergencia Temprana, *Annona cherimola*, el chirimoyo”

10:00 **José Mora Perujo**: “Characterizing the involvement of UDP-glycosyltransferase in the re-direction of the ellagitannin and phenylpropanoid metabolisms”

10:15 **Laura Mancera Miranda**: “Analysis of DNA methylation in *Pseudomonas syringae*”

10:30 **Francisco Percio Vargas**: “Filling the gap between salt stress perception and TTL proteins in cellulose biosynthesis adaptation”

10:45 **Juan Carlos Mateos del Amo**: “Análisis de expresión génica en líneas introgresadas de tomate desvelan nuevos genes candidatos para la deposición de cutícula”

11:00 **Ana León Rodríguez**: “Cuando menos es más: reversión de la memoria inmune de la microglía condicionada mediante la inhibición parcial del receptor CSF1R”

11:15 - 12:30 Café y Sesión de Póster (“defensa” informal de póster)

12:30 - 13:00 Clausura y entrega de premios

13:00 - 14:00 Conferenciante invitado Antonio de Dios



COMUNICACIONES ORALES



Characterizing viral determinants and mechanisms that determine Tomato leaf curl New Delhi virus host range

Verónica Pérez-Rubio, Isabel M. Fortes, Beatriz Romero Rodríguez, Enrique Moriones and Araceli G. Castillo.

*Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM, UMA-CSIC), Málaga, Spain.
veronicaperez@uma.es*

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) is a bipartite begomovirus (genus Begomovirus, family Geminiviridae) which is transmitted in nature by the whitefly *Bemisia tabaci* (order Hemiptera, family Aleyrodidae) (Zaidi *et al.* 2016). This virus causes devastating damage to multiple cultivated plant species mainly belonging to the Solanaceae and Cucurbitaceae families, and it is accountable for one of the most predominant and economically important diseases in tomato crops in the Indian sub-continent (Zaidi *et al.* 2016). Although, the epidemics of ToLCNDV were initially limited to Asian countries, this geminivirus has rapidly extended its host range and spread to new geographical regions. In 2012 it was first reported in Spain, causing severe epidemics in cucurbit crops (Fortes *et al.* 2012).

ToLCNDV genome contains two single-stranded circular DNA molecules (ssDNA) (named DNA-A and DNA-B). The DNA-A has six open reading frames (ORFs) (named AC1, AC2, AC3, AC4, AV1 and AV2) that encode six proteins involved in virus replication, transcription of viral genes, pathogenesis, and its encapsidation. The DNA-B has only two ORFs (BC1 and BV1) that encode two proteins involved in the movement of the virus. Both genome components share a similar sequence named common region, which aid in replication of DNA-B by a DNA-A-encoded replication initiator protein (Padidam *et al.* 1995).

Previous results have demonstrated that isolates spreading throughout the western Mediterranean Basin belong to a novel strain of ToLCNDV (strain ES) and cause severe infections in cucurbit crops but poorly infect tomatoes (Fortes *et al.*, 2012). However, existence of ToLCNDV isolates from India that severely affect tomato plants has been reported. Our main goal is to identify the viral determinants and to understand the mechanisms associated to the ability of some isolates of ToLCNDV to infect tomato efficiently. Therefore, we have agroinoculated tomato cv Moneymaker with clones from ToLCNDV-Spain isolate (ToLCNDV-[ES]; isolate unable to induce efficient infections in tomato) and ToLCNDV-India isolate (ToLCNDV-[IN], which efficiently infects tomato). The results from local and systemic infections with both viruses and pseudorecombinants between DNA-A and DNA-B components of the bipartite ToLCNDV-[ES] and ToLNCDDV-[IN] will be shown and discussed.



References:

Fortes et al., 2012. *Viruses*

Padidam et al., (1995), *J. Gen. Virol* 76, 25–3

Zaidi et al., *Mol. (2016) Plant Pathol.* 18, 901–911

Acknowledgements and funding

The authors would like to thank Adela Zumaquero and Victoria Motos for technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF) (grant PID2019-107657RB-C21 to E.M., grant PID2019-107657RB-C22 to A.G.C. and FPI fellowship number PRE2020094458 to V.P.R.)



Characterization of the translational landscape of the plant-virus interaction

Gemma Sans Coll^{1,2}, Araceli G. Castillo^{1,3}, Eduardo R. Bejarano^{1,3} and Catharina Merchante¹

¹IHSM-UMA-CSIC, ²Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, UMA, ³Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, UMA; Málaga, Spain
E-mail: gemmasans@uma.es

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is responsible for massive damage to tomato crops around the world (Prasad et al., 2020). Due to its viral nature, it requires the host's cellular machinery to be able to infect, which implies complex interactions between the virus and the plant. Most studies about this association are based on transcriptomics and interactomics, while translational analyses have, so far, been scarce. Understanding the translational mechanisms that are responsible for the production of viral proteins and, consequently, its propagation will allow to shed some light on these interactions and gain knowledge about the changes at the translational level that tomato plants experience upon infection. To that end, we are characterizing the translational landscape of the plant-virus interaction using RNA-seq of polysomal RNA. To deepen our knowledge of the regulatory mechanisms involved in the translational response, two isogenic tomato lines, one resistant (the *ty-5* mutant) and one susceptible (Santa Clara) to TYLCV are being employed. *Ty-5* is a recessive mutation located on the *Pelota* gene, which is involved in the recycling phase of the translation cycle (Lapidot et al., 2015), so the study of this mutant will inform about the role of the translational machinery in the viral infection. In addition, and using RIP+MS, we are attempting to uncover the translational machinery associated to viral transcripts to determine if certain riboproteins or translation factors are preferred for the translation of viral transcripts.

We will present the advances we have made regarding these objectives.

References

Lapidot et al. *PLoS Genet.* 11:e1005538.

Prasad et al. *Trends Plant Sci* 2020 Sep;25(9):897-911.

Acknowledgments: The authors are grateful to Rafael Fernández-Muñoz (IHSM) for sharing the *ty-5* and Santa Clara tomato seeds. This work is funded by Grant P18-RT-1218 from the Junta de Andalucía to CM and ERB, and grants RYC2017-22323 and PID2021-12324NB-100 to CM.



Regulación genética del Desarrollo del Tegumento del Óvulo en una Angiosperma de Divergencia Temprana, *Annona cherimola*, el chirimoyo

María García-Lezama¹, Jorge Lora¹, José I. Hormaza¹

¹*Grupo de Mejora y Biología del Desarrollo de Frutales Subtropicales, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora' (IHSM-UMA-CSIC), Algarrobo-Costa, 29750, Málaga, España*

E-mail: mariagl@ihsm.uma-cisc.es

Para comprender los procesos evolutivos de las plantas con flor, es esencial estudiar el desarrollo floral en angiospermas de divergencia temprana. *Annona cherimola* y *A. squamosa*, pertenecen a las anonáceas (Annonaceae), la familia más extensa entre las angiospermas de divergencia temprana. El mutante espontáneo sin semillas (Thai seedless; Ts) de *A. squamosa* es especialmente valioso para estudios evolutivos sobre el desarrollo del óvulo debido a una mutación en el gen INNER NO OUTER (INO), que resulta en la ausencia del tegumento externo del óvulo [1].

En este estudio, nuestro objetivo es revelar los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo de los tegumentos del óvulo en *Annona*, utilizando Ts y prestando especial atención a los genes relacionados con INO. Inicialmente, realizamos un estudio histológico para examinar el desarrollo del óvulo y el embrión en *A. squamosa* Ts, y en tipos normales de *A. cherimola* y *atemoya* (híbrido entre *A. cherimola* y *A. squamosa*). El mutante Ts exhibió un óvulo ortótropo y unitégmico que carece del tegumento externo, en contraposición con el óvulo bitégmico y anátropo de los genotipos normales. A pesar de estas diferencias, el óvulo de Ts presentó un desarrollo normal del saco embrionario. Después de la polinización, Ts mostró diferencias en la división celular del endospermo y el desarrollo del cigoto en comparación con genotipos normales de *atemoya*.

En un análisis posterior, evaluamos la regulación genética del desarrollo del tegumento externo a través de un estudio transcriptómico, comparando los perfiles de expresión génica de Ts y un genotipo normal de *A. cherimola* durante el desarrollo del óvulo. Aunque ambas especies compartieron rutas comunes relacionadas con el desarrollo del pistilo, identificamos una expresión diferencial significativa de genes clave, incluido INO. Asimismo, evaluamos la expresión de genes clave adicionales (ATS, NZZ, WUS) implicados en el desarrollo del tegumento mediante hibridación in situ, revelando una expresión específica de estos genes en el óvulo tanto del tipo normal de *A. cherimola* como de Ts.

Estos resultados contribuyen a nuestra comprensión de los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo del tegumento en Annonaceae, destacando



las diferencias morfológicas y de expresión génica entre Ts y los genotipos normales de Annona.

[1] Lora, J., Hormaza, J. I., Herrero, M., & Gasser, C. S. (2011). Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(13), 5461-5465.

Esta investigación está financiada por el proyecto PID2019-109566RB-I00 y la beca predoctoral PRE2020-094858 (Ministerio de Ciencia e Innovación).



Characterizing the involvement of UDP-glycosyltransferase in the re-direction of the ellagitannin and phenylpropanoid metabolisms

José Mora¹, Delphine M. Pott¹, Iraida Amaya², Björn Usadel³, Jose G. Vallarino¹
and Sonia Osorio¹.

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora". Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Málaga- (IHSM-CSIC-UMA)*

²*IFAPA Centro Málaga, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Cortijo de la Cruz s/n, 29140, Churriana, Málaga, Spain.*

³*IBG-4, Institute for Bio-and Geosciences, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, Germany*

Email: mora@uma.es

Fresh strawberries are a popular and important part of the human diet. Demand for high quality fruit is increasing worldwide, challenging breeders to develop modern strawberry varieties that meet all the desired characteristics. The shikimate and phenylpropanoid pathways produce many chemical compounds, such as phenolic compounds, polyphenols and tannins, which are highly valuable in human nutrition, providing antioxidant protection and helping to prevent some diseases. Among them, the hydrolysable tannins, such as ellagitanins and ellagic acid, have a health impact on some human diseases, such as breast and prostate cancer or neurodegenerative diseases (Basu *et al.*, 2014). In a previous study, Pott *et al.*, (2020) found 110 stable QTL for secondary metabolism by studying the F₁ population derived from the crossing of '232' and '1392' (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011). Among these QTLs, we highlighted one that was responsible for 50-70% of the variation of ellagic acid hexose. Using RNAseq data from contrasting lines for ellagic acid hexose content, a candidate gene annotated as UDP-glycosyltransferase was identified, suggesting that is involved in the glycosylation of ellagic acid. In addition, we found that the expression of this candidate gene was negatively correlated with proanthocyanidin and flavan-3-ol content, providing evidence for a possible redirection of metabolic flux through the synthesis of ellagitannins. The expression of this UDP-glycosyltransferase is not consistent in all strawberry cultivars, with 'Florence', 'Gariguette', 'Sonata' and 'Senga Sengana' being some of the cultivars where some expression can be found. Also, the DNA sequence of the candidate gene seems to be different from that annotated in the 'Camarosa' variety. This led to the cloning of the gene from 'Senga Sengana' and the study of its subcellular localization and involvement in secondary metabolism. To this end, agroinfiltration of 'Candongia' fruits was carried out with a construct of the candidate gene under the control of a constitutive 35S promoter.



References.

Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., and Lyons, T. J. (2014). *Strawberry as a functional food: An evidence-based review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 790–806. doi:10.1080/10408398.2011.608174

Pott, D. M., Vallarino, J. G., Cruz-Rus, E., Willmitzer, L., Sánchez-Sevilla, J. F., Amaya, I., et al. (2020). *Genetic analysis of phenylpropanoids and antioxidant capacity in strawberry fruit reveals mQTL hotspots and candidate genes. Sci. Reports* 2020 101 10, 1–15. doi:10.1038/s41598-020-76946-x.

Zorrilla-Fontanesi et al., (2011). *Theoretical and Applied Genetics* 123(5), 755-778. doi: 10.1007/s00122-011-1624-6.

Acknowledgements & Funding

This work was supported by grants PID2021-128527OB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). In addition, we acknowledge partial funding by PY20_00408 (PAIDI 2020-Junta de Andalucía) and European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement ID: 101000747). JGV acknowledges the EMERGIA Programme (EMERGIA20_00309-Junta de Andalucía) and Ramón & Cajal program (RYC2021-034936-1, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). J.M thanks to Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PRE2019-091188).



Analysis of DNA methylation in *Pseudomonas syringae*

Mancera-Miranda, Laura¹, López-Pagán, Nieves¹, Coissac, Aurore², Legrand, Ludovic², Gutiérrez-Pozo, Gabriel³, Spröer, Cathrin^{4,5}, Bunk, Boyke^{4,5}, Guidot, Alice², Sánchez-Romero, María Antonia³, Ruiz-Albert, Javier¹, Beuzón, Carmen¹.

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga, Spain.*

²*LIPME, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, Castanet-Tolosan, France.*

³*Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.* ⁴*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.* ⁵*German Centre of Infection Research DZIF, Braunschweig, Germany*

E-mail: lauramm@uma.es

DNA methylation is the main epigenetic mechanism in bacteria and archaea. Contrary to what happens in eukaryotes, the most common DNA methylation in prokaryotes is adenine methylation. In *E. coli* and *Salmonella*, this mechanism has been associated with regulation of the initiation of replication, DNA mismatch repair and transcription. In the transcription process, the methylation state affects the interaction between transcriptional regulators and promoters. In these species, this link between DNA methylation and transcription can give rise to phenotypically differentiated subpopulations within clonal populations, a process known as phenotypic heterogeneity, with strong implications for virulence (Adhikari & Curtis, 2016). However, nothing is known about DNA methylation in *Pseudomonas syringae*. *P. syringae* is a phytopathogen of academic relevance, as a model for plant-pathogen interactions, and worldwide impact in crop production since as a species complex it can infect a wide range of plants of agronomical relevance (Xin et al., 2018).

Our group has demonstrated that expression of the type III secretion system (Rufián et al., 2016) and flagella (López-Pagán et al., 2024), two traits relevant for virulence, is phenotypically heterogeneous in *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (Pph). Thus, our laboratory has a growing interest in understanding the role of DNA methylation in *P. syringae* as an epigenetic mechanism affecting regulation of adaptive processes. For this purpose, we have determined the methylome of two important models of *P. syringae*: *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Pto) and *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (Pph) and found specific adenines methylation motifs. We have also generated mutant strains and expression plasmids for predicted methylase genes. Characterization of these strains led us to find several phenotypes associated with methylase altered levels.

References:

Adhikari S. and Curtis P.D., 2016. *FEMS Microbiol. Rev.*, 40(5), 575-591

López-Pagán et al., 2024. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.03.12.584633>

Rufián JS. et al., 2016. *Environ. Microbiol.*, 18(10), 3593-360

Xin X. et al., 2018. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16(5), 316-328



Filling the gap between salt stress perception and TTL proteins in cellulose biosynthesis adaptation

Percio, Francisco¹; Toth, Ryan²; DeFalco, Thomas A.^{2,4}; Persson, Staffan³; Zipfel, Cyril²; Amorim-Silva, Vitor¹; Botella, Miguel A.¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Málaga, 29071, Spain.*

²*Institute of Plant and Microbial Biology and Zürich-Basel Plant Science Center, University of Zürich, 8008 Zürich, Switzerland.*

³*Copenhagen Plant Science Center, Department of Plant & Environmental Sciences, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, 1871, Frederiksberg C, Denmark.*

⁴*Department of Biology, Western University, London ON N6A 5B7, Canada.*

E-mail: franciscopercio@uma.es

Plant cell wall cellulose comprise over 27% of all biomass on Earth, making it the most abundant organic compound [1]. It is essential for plant development and response to the environment, but despite its relevance, a lot remains unknown about its biosynthesis regulation and further applications for the improvement of crop's tolerance to biotic and abiotic stresses. We have described the Tetratricopeptide Thioredoxin-Like (TTL) [2] proteins as regulators of the cellulose synthase complex (CSC) dynamics under cellulose-deficient conditions [3]. TTLs are required to maintain cellulose synthesis under salt stress by relocalising from cytosol to the CSC, promoting the polymerization of microtubules to form a stress-resilient cortical microtubule array, and stabilizing CSC at the plasma membrane. It was yet unclear how TTLs are targeted to the CSC. We have found that TTL3 is a substrate for a kinase whose Arabidopsis mutants show cellulose-defective phenotypes under stresses that affect cell wall integrity. We have found that this phosphorylation regulates TTL3 relocalisation, leading to modifications in cellulose deposition to adapt to salt stress. Our study provides new insights into how phosphorylation regulates the activity and dynamic localization of these proteins, and its role in cellulose biosynthesis.

[1] Bar-On, Y. M., Phillips, R. & Milo, R. 2018. The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 6506–6511.

[2] Amorim-Silva, V. et al. 2019. TTL proteins scaffold brassinosteroid signaling components at the plasma membrane to optimize signal transduction in arabidopsis. *Plant Cell* 31, 1807–1828.

[3] Kesten, C., García-Moreno, A., Amorim-Silva, V. et al. 2022 Peripheral membrane proteins modulate stress tolerance by safeguarding cellulose synthases. *Sci. Adv.* 8(46):eabq6971.

Acknowledgments and funding

This work was funded by the Spanish Ministry for Science and Innovation (PID2020-114419RB-I00MCIN/AEI/10.13039/501100011033) to MAB. The Andalusian Research Plan co-financed by the European Union (PAIDI 2020-PY20_00084 and UMA20-FEDERJA-023) to MAB. FP was supported by FPU19/02219 fellowships and EMBO Scientific Exchange Grant 10026. VAS was supported by an Emerging Investigator research project (UMA20-FEDERJA-007) and co-financed by the “Programa Operativo FEDER 2014-2020” and by the “Consejería de Economía y Conocimiento de la Junta de Andalucía”. Funding from the University of Zürich, and the Swiss National Science Foundation grants no. 31003A_182625 and no. 310030_212382 (to CZ).



Análisis de expresión génica en líneas introgresadas de tomate desvelan nuevos genes candidatos para la deposición de cutícula

Juan Carlos Mateos del Amo^{1,2}, Eva Domínguez¹, Antonio Heredia^{1,2}, Fernando Gallardo², Rafael Fernández-Muñoz¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", IHSM, UMA-CSIC, 29010, Málaga. ²Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga (UMA), 29010, Málaga
E-mail: jcma@uma.es

La cutícula es la capa más externa que recubre los órganos aéreos de la planta y los protege de estreses bióticos y abióticos. Debido a sus propiedades únicas, la modificación de la cutícula debe ser considerada en la mejora y protección de los cultivos. A pesar del creciente interés en describir las propiedades de la cutícula, los conocimientos actuales sobre los genes responsables de la deposición de la cutícula durante el desarrollo de los órganos vegetales siguen siendo fragmentarios.

En tomate, un trabajo previo del grupo identificó dos regiones en el cromosoma 3 como QTLs para la cantidad de cutícula del fruto (*cm3.1* y *cm3.2*). En una nueva población de Líneas de Introgresión (IL) que portan un fragmento de la secuencia de la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* acc. TO-937, las líneas de la región del cromosoma 3 que contienen *cm3.1* y *cm3.2* tenían menos cantidad de cutícula de fruto que las que contenían los alelos de los QTL de la especie cultivada *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker (MM) [1]. Con el objetivo de encontrar genes candidatos para estos QTLs, se analizó la expresión de 42 genes ubicados en las dos regiones de pico de los QTLs mediante RT-qPCR a lo largo del desarrollo del fruto en la línea IL sp3-3 (que contiene los alelos de *S. pimpinellifolium* de *cm3.1* y *cm3.2* en el fondo genético de MM) y en el cultivar MM.

Los genes con las diferencias más grandes en sus perfiles de expresión se volvieron a analizar utilizando frutos de dos ILs acortadas obtenidas a partir de sp3-3 que portan regiones de pico aisladas de *cm3.1* y *cm3.2*, evitando así posibles interferencias en el estudio de la deposición de la cutícula con otros QTLs/genos conocidos que co-localizan en la proximidad, especialmente, de *cm3.2*. Los resultados obtenidos de este segundo análisis fueron consistentes con el primero y redujeron la lista de genes candidatos en las dos regiones a tres.



Para la validación funcional de los genes candidatos seleccionados, se diseñaron seis construcciones de silenciamiento mediante VIGS en la plataforma TRV, tres exclusivamente con la secuencia de silenciamiento específica del gen y tres que portaban también el gen de la fitoeno desaturasa de tomate, actuando como reportero visual [2]. La agroinfiltración de frutos está en curso y se espera que el análisis de la masa de cutícula de los frutos obtenidos tras el silenciamiento se concluya después del verano.

[1] Barraj, R., Segado, P., Moreno-González, R., Heredia, A., Fernández-Muñoz, R. and Domínguez, E. 2021. *Genome-wide QTL analysis of tomato fruit cuticle deposition and composition. Hort. Res. 8:113*

[2] Orzaez D, Medina A, Torre S, Fernández-Moreno JP, Rambla JL, Fernández-Del-Carmen A, Butelli E, Martín C, Granell A. *A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. Plant Physiol. 2009 Jul;150(3):1122-34.*

Investigación financiada por los proyectos RTI2018-094277-B-C2, PID2021-126604OB-C21/C22 y el contrato PRE2019-087788 de MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ 'FEDER una manera de hacer Europa'.



Cuando menos es más: reversión de la memoria inmune de la microglía condicionada mediante la inhibición parcial del receptor CSF1R

Ana León Rodríguez^{1,2}, Jesús Mateos Grondona^{1,2}, Sonia Marín Wong¹, María Dolores López Ávalos^{1,2}.

¹Área de Fisiología Animal. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga (España)

²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA Plataforma BIONAND)

E-mail: analeonrodriguez@uma.es

Las células de la microglía son esenciales en la neuroinflamación, proceso durante el cual se activan, volviendo posteriormente a su estado de reposo/vigilancia. En ocasiones la microglía adquiere memoria inmunológica de eventos neuroinflamatorios previos, denominándose microglía condicionada. La microglía condicionada genera respuestas exacerbadas y potencialmente neurotóxicas, por lo que es importante encontrar estrategias encaminadas a su control. El receptor CSF1R, que se expresa en células mieloides como la microglía, es fundamental para la viabilidad de estas células. Su inhibición (por ejemplo, con PLX5622) conduce a una reducción importante de esta población en el cerebro. Cuando se interrumpe el tratamiento con PLX5622 la microglía prolifera y su población se restaura. Hay evidencias de que esta nueva microglía tiene un fenotipo de reposo/vigilancia. Nuestro objetivo fue determinar si el condicionamiento de la microglía puede ser revertido con un tratamiento moderado con PLX5622 que no conlleve una depleción completa de la microglía. El condicionamiento de la microglía se indujo tras neuroinflamación aguda provocada por inyección intracerebroventricular de neuraminidasa (NA). Tres semanas después recibieron el tratamiento con PLX5622 (una inyección intraperitoneal (IP) diaria durante 12 días), tras el cual se permitió un período de repoblación de la microglía de 7 semanas. Doce horas antes del sacrificio se aplicó un estímulo inflamatorio periférico (lipopolisacárido) para provocar la activación de la microglía condicionada. Los cerebros se procesaron para estudiar el grado de activación de la microglía, concretamente en hipotálamo e hipocampo. El tratamiento con PLX5622 provocó una depleción parcial de la microglía del 40-50%, que estaba recuperada al final del experimento. El LPS indujo microgliosis en el hipocampo (no en el hipotálamo), que fue revertida tras el tratamiento con PLX5622. El análisis morfológico de la microglía reveló un perfil más activado en los animales inyectados con NA, que se revertía con el tratamiento de PLX5622. Además, esta reversión se corroboró con el análisis de la expresión de genes inflamatorios (IL1 β , IL6, TNF α , NLRP3, TLR4). Estos resultados sugieren que dosis reducidas de PLX5622 revierten el estado



condicionado de la microglía hacia un fenotipo homeostático, sin necesidad de pasar por una situación de depleción severa de su población.

ALR disfruta de un contrato de formación del profesorado (FPU21/05602). SMW ha disfrutado de una beca de colaboración del Ministerio de Educación y Formación Profesional. Este proyecto se ha desarrollado con los fondos de un proyecto del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF2017-83645).



PÓSTERES



Genome-Wide Association Study (GWAS) for agronomic and water use-efficiency traits in strawberry

Mario Ruiz-Velázquez¹, Francisco Javier Roldán Guerra¹, Cristina Castillejo¹, José F. Sánchez-Sevilla^{1,2}, Elsa Martínez Ferri^{1,2}, María-Teresa Ariza Fernández¹, Iraida Amaya^{1,2}

¹*Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro IFAPA de Málaga, Málaga, Spain.*

²*Unidad Asociada de I+D+i IFAPA-CSIC Biotecnología y Mejora en Fresa, Málaga, Spain.*

Cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) is one of the most important crops worldwide due to its economic impact and appreciated flavor. Due to climate change, current drought and water scarcity may compromise the viability of this crop in Spain in the near future. Therefore, improving crop water use efficiency (WUE) by searching for associated genes might allow the selection or development of strawberry varieties that tolerate better drought without compromising fruit productivity and quality.

Genome-wide association studies (GWAS) identify genetic variants affecting an observable trait. In this study, we performed GWAS on a selection of 138 diverse accessions from the *Fragaria* germplasm collection at IFAPA. We genotyped the strawberry collection using 40,808 SNPs and evaluated GLM, MLM, FarmCPU and BLINK models using the R package 'GAPIT3' (Wang *et al.*, 2020).

A total of 37 traits related to WUE, agronomic, physiological and fruit quality traits are being evaluated during two consecutive seasons and in two different irrigation regimes: well-watered and water limited. First season data in well-watered conditions revealed a wide phenotypic variation for most traits in the strawberry collection.

Notably, a strong positive correlation was observed between projected plant area and key agronomic characters like fruit productivity and fruit weight. Furthermore, our data uncovered positive correlations between leaf dry biomass and root dry biomass and median number of roots.

Preliminary GWAS for the traits have resulted in the detection of 14 significant SNPs associated with traits such as CO₂ assimilation rate, fluorescence quantum yield, stomatal density, fruit weight and firmness. We are searching for candidate genes in Linkage disequilibrium (LD) with the significant SNPs using the tool Haploview (Barret *et al.*, 2005).

References

Barret *et al.*, 2005. *Bioinformatics*, 21 (2)

Wang *et al.*, 2020. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 19 (4)

This work is supported by grant PID2019-111496RR-I00 and PID2022-138290OR-I00 (MCIN/AEI / 10.13039/501100011033 / y por FEDER Una manera de hacer Europa) and the EU H2020 research and innovation programme (BreedingValue project, grant agreement No 101000747). M. Ruiz-Velázquez acknowledge a PhD contract (INIA-2021-0001) from AEI. The *Fragaria* collection of IFAPA is financed through the IFAPA Project PR.CRF.CRF202200.002 within the Rural Development Program of Andalusia 2014-2022.



Unveiling Ca²⁺ signaling at ER-PM CS: role and interplay of SYT1 and ER-localized Ca²⁺ pumps ECA1/ECA4

Morello-López, Jorge¹; Rubio, Lourdes¹; Botella, Miguel A¹.

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”*

Calcium, a crucial second messenger, modulates many downstream events in response to environmental changes, such as salt stress. While there is abundant knowledge about Ca²⁺ homeostasis at ER-Plasma Membrane Contact Sites (ER-PM CS) in animal cells, information on this subject in plants is minimal. Our proteomic data of SYT1, a key ER-PM CS member in plants, reveal the ER-localized SERCA plant homologs ECA1 and ECA4 as SYT1 interactors. Therefore, ECA1 and ECA4 genes, along with SYT1, might play a role in Ca²⁺ signaling at plant ER-PM CS during salt stress.

As ECA1 and its close homolog ECA4 are linked genes, we generated an *eca1/eca4* double mutant using CRISPR/Cas9 technology since this mutant cannot be produced by standard crossing. The *eca1/eca4* double mutant does not present any apparent phenotype in rosette and stem development but exhibits a clear defect in silique formation, resulting in a very low seed yield per plant. We plan to test *eca1/eca4* and *syt1* root growth phenotypes under increasing Na⁺ concentrations at both low and high concentrations of extracellular Ca²⁺, aiming to provide information about the role of ECA1 and ECA4 in response to salt stress and external Ca²⁺.

On the other side, we analyzed *in vivo* changes of cytosolic Ca²⁺ in both *syt1* and *eca1/eca4* mutants in response to NaCl and flg22 treatments, using a constitutively expressed cytosolic Ca²⁺ reporter (Knight et al., 1991). Our preliminary results on this matter demonstrate differences in the *syt1* Ca²⁺ wave compared to Col0 when treated with 100 mM of NaCl, suggesting that SYT1-enriched ER-PM CS could be involved in local, rapid changes in cytoplasmic Ca²⁺ concentration.

References

Knight, M., Campbell, A., Smith, S. et al. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526 (1991). <https://doi.org/10.1038/352524a0>



RALF perception monitor cell wall integrity during tomato fruit ripening

José A Montano¹, Ana M Luna¹, Marta Carrera¹ and Verónica G Doblas¹.

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain.
E-mail: monti033@uma.es

Cell wall is one of the key determinants of plant cell and organ shape. The enlargement of fruit cells is determined by the plastic response of the wall to the mechanical force induced by the internal turgor pressure. Progression in ripening induces the degradation of cell wall components, where the pectin degradation is the main factor, and this leads to softening of the fruit. This process has to be well regulated to ensure that the integrity of cell wall and the fruit growth are well coordinated. Small Signaling Peptides from Rapid Alkalinization Factor (RALF) family are emerging as key signaling components for cell wall integrity during cell wall remodeling. RALFs are cys-rich peptides conserved in terrestrial plants. RALFs peptides can bind Leucine-Rich Repeat Extensin proteins (LRXs) by itself and *Catharanthus roseus* RLK1-Like (CrRLK1L) receptors in association with LORELEI (LRE)-LIKE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI) ANCHORED PROTEIN (LLG) forming a trimeric signaling complex (Zhu et al., 2021). A tomato fruit formation is a perfect model to further understand the role of this mechanism, since requires a tightly regulated expansion of the cell wall during the rapid cell elongation phase, and during the late cell wall softening phase. Here, we initiate a biochemical and phenotypical characterization of tomato RALF/CrRLK1L/LRX proteins in order to elucidate their role during fruit formation process.



Análisis comparativo del secretoma de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 y *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 1448a

Hilario Domínguez-Cerván^{1,2}; Luis Díaz-Martínez³; Cayo Ramos^{1,2}; Luis Rodríguez-Moreno^{1,2}.

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos s/n, Universidad de Málaga, E- 29010 Málaga ²Microbiología 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
E-mail: lgrodriguez@uma.es

El complejo *Pseudomonas syringae* incluye un total de 15 especies bacterianas, con más de 60 patovares, caracterizadas por su capacidad de causar enfermedad en un amplio número de plantas de interés agrícola (Gomila et al., 2017). La especie *Pseudomonas savastanoi*, perteneciente al complejo *P. syringae*, engloba 7 patovares distintos, denominados según el huésped del que se han aislado sus cepas (Caballo-Ponce et al., 2021). Entre los principales factores de virulencia presentes en *P. savastanoi* destacan su capacidad para sintetizar ácido indolacético (IAA), un regulador del crecimiento vegetal, y la presencia de un sistema de secreción tipo III (T3SS) con el que translocar proteínas efectoras al interior de las células vegetales.

Además del T3SS, las bacterias fitopatógenas presentan mecanismos adicionales para secretar proteínas al espacio extracelular (Green & Mecsas, 2016). En este trabajo hemos caracterizado, mediante espectrometría de masas, el secretoma de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335, aislada de olivo, y *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (Pph) 1448a, aislada de judía, así como sus respectivos mutantes *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 aquellas que contenían un péptido señal para su secreción y una localización subcelular adecuada, descartando todas aquellas que contenían regiones hidrofóbicas en su secuencia. En total, se obtuvieron 321 proteínas en Psv y 274 en Pph. Mediante análisis comparativos identificamos 28 funcionalidades exclusivas de Psv, representadas por 69 proteínas, y 13 funcionalidades exclusivas de Pph, representadas por 32 proteínas extracelulares. Además, se obtuvieron 34 funcionalidades comunes entre Psv y Pph, correspondientes a 144 proteínas en Psv y 140 en Pph. Entre las proteínas con funcionalidades comunes hemos identificado 5 que contienen en su secuencia un dominio LysM, especializado en la unión a carbohidratos. Mutantes de pérdida de función generados en cada uno



de estos genes sugieren un importante papel en la virulencia de Psv para cada una de estas proteínas.


Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las proteínas secretadas al espacio extracelular contribuyen a la virulencia de las cepas fitopatógenas durante su interacción con el huésped.

Caballo-Ponce, E., Pintado, A., Moreno-Pérez, A., Murillo, J., Smalla, K., and Ramos, C. (2021). Pseudomonas savastanoi pv. mandevillae pv. nov., a clonal pathogen causing an emerging, devastating disease of the ornamental plant Mandevilla spp. Phytopathology 111(8), 1277-1288. doi:10.1094/PHYTO-11-20-0526-R.

Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the Pseudomonas syringae species group based on a phylogenomic analysis. Front. Microbiol. 8, 2422. doi: 10.3389/fmicb.2017.02422.

Green, E. R., and Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: An overview. Microbiol. Spectr. 4(1). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.

Financiado por los proyectos P20-00122 (Junta de Andalucía-FEDER) y PID2020-115177RB-C21 (MICINN-FEDER). Contrato predoctoral PRE2021-099113 (MICINN).



WhpR, an orphan transcriptional regulator of virulence in the pathogen of woody hosts *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Antonio Arroyo Mateo^{1,2}, Luis Rodríguez Moreno^{1,2}, Cayo Ramos^{1,2}

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

²Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora», Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), 29010 Málaga, Spain


E-mail: antonioam@uma.es

The genome of the olive tree pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 encodes a region of about 15 kb named WHOP (from Woody Host and P*seudomonas*), which is involved in the catabolism of aromatic compounds. This region is shared with other *Pseudomonas syringae* strains infecting woody hosts, but it is absent in strains infecting herbaceous plants. The WHOP region is organized into four operons, i.e. *antABC* (catabolism of anthranilate), *catBCA* (catabolism of catechol) *ipoBCA* (oxygenase activity) and *dhoAB* (degradation of phenolic compounds), and three independently transcribed genes, *antR* (positive regulator of the *antABC* operon), *PSA3335_3206* (hypothetical aerotaxis receptor) and *whpR* (AraC family regulator) [1]. In this study we have analysed the presence of WHOP-encoded genes in different bacteria regardless of conservation of the gene synteny of Psv NCPPB 3335. Also, we identified two domains in WhpR, a DBD (DNA binding domain), characterised by a classical HTH (Helix-Turn-Helix) motif and an AraC-like binding domain. RNA-seq transcriptomic analyses involving Psv strain NCPPB 3335 and a mutant lacking *whpR* (Psv $\Delta whpR$) showed that WhpR is a negative regulator of both the WHOP region and the tryptophan synthase (*trpAB*) operon. The WHOP region is essential for full virulence of Psv in woody olive plants [1]. Moreover, Psv $\Delta whpR$ is hypervirulent in woody olive plants but not in *in vitro* micropropagated plants. Considering that the *trpAB* operon is likely connected to the biosynthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA), a pathogenicity factor in Psv, we are currently analysing the production of auxins in Psv $\Delta whpR$. In addition, we are approaching the transcriptional regulation performed by WhpR using q-RT-PCR and transcriptional fusions of the promoter regions of several WHOP genes to *lacZ*. Furthermore, purification of WhpR is in progress. Our results contribute to the understanding of virulence factors in plant pathogens of woody hosts and encourage future studies to examine their interaction with the host.



[1] *Caballo-Ponce et al. (2017) Mol. Plant-Microbe Interact. 30(2): 113–126.*

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto PID2020-115177RB-C21/AEI/10.13039/501100011033, co-financiado por FEDER y P20-00122 (Junta de Andalucía-FEDER)



Búsqueda y caracterización de nuevos compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis e inflamación

Isabel Vidal Valenzuela¹, Miguel Ángel Medina^{1,2,3} y Beatriz Martínez-Poveda^{1,2,4}.

¹*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Andalucía Tech, 29071 Málaga, España.* ²*Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina, IBIMA Plataforma BIONAND, 29590 Málaga, España.* ³*CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, España.* ⁴*CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, España.*

Una línea de investigación significativa en farmacología es la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades de alta prevalencia, como son las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer. En ellas destacan ciertos procesos fisiopatológicos comunes por su implicación durante su inicio o desarrollo (inflamación, vascularización y regulación del metabolismo celular, entre otros^{1,2}). El descubrimiento de moléculas capaces de modular estos procesos comunes podría suponer una ventaja en el desarrollo de nuevos candidatos a fármacos, siendo esta la principal hipótesis de este Proyecto de Tesis Doctoral, que propone explorar el potencial bioactivo de compuestos naturales y sintéticos en el contexto de la inflamación y el metabolismo endotelial, y la angiogénesis.

Como modelo de estudio utilizamos cultivos celulares primarios de endotelio, tanto de origen bovino (BAEC, *Bovine Aortic Endothelial Cells*) como humano (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Para evaluar la respuesta endotelial a la inflamación *in vitro* realizamos ensayos de expresión de moléculas inflamatorias mediante rt-qPCR, *Western-blot* y citometría, y analizamos el estado de activación de vías de señalización inflamatorias mediante *Western-blot* e inmunofluorescencia. El estado metabólico general de las células se evalúa en el analizador Seahorse XF (*Agilent*), que nos permite medir la OCR (*Oxygen Consumption Rate*) y la ECAR (*Extracellular Acidification Rate*). La modulación de la angiogénesis se evalúa mediante ensayos optimizados para diversos pasos del proceso (supervivencia y análisis de ciclo celular, morfogénesis sobre Matrigel, migración e invasión celular, entre otros).

Nos hemos centrado en tres compuestos fundamentalmente: el dimetil itaconato (DMI, derivado del metabolito itaconato), el PFK15 (molécula pequeña inhibidora de la enzima PFK3B) y la aeroplisinina-1 (Apl-1, compuesto natural aislado de



una esponja marina). En este póster se muestran resultados en relación al efecto de estos compuestos en inflamación (Apl-1), estado metabólico celular (PFK15) y angiogénesis (PFK15 y DMI), que han sido parcialmente publicados en revistas especializadas.

En el marco de este Proyecto de Tesis hemos identificado el potencial inhibidor de angiogénesis del DMI³ y el PFK15, y el efecto antiinflamatorio de la Apl-1 en el endotelio⁴, mientras que el papel sobre el estado metabólico endotelial está siendo explorado para completar los objetivos propuestos.

Bibliografía:

- 1. Hanahan D. (2022) *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov.* 12(1), 31-46.
- 2. Wilson DM 3rd, Cookson MR, Van Den Bosch L, Zetterberg H, Holtzman DM, Dewachter I. (2023) *Hallmarks of neurodegenerative diseases*. *Cell*, 186(4), 693-714.
- 3. Vidal, I., Fernández-Florido, E., Marrero, A. D., Castilla, L., R Quesada, A., Martínez-Poveda, B., & Medina, M. Á. (2022) *The Immunomodulator Dimethyl Itaconate Inhibits Several Key Steps of Angiogenesis in Cultured Endothelial Cells*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15972.
- 4. Vidal, I., Castilla, L., Marrero, A. D., Bravo-Ruiz, I., Bernal, M., Manrique, I., R Quesada, A., Medina, M. Á., & Martínez-Poveda, B. (2022) *The Sponge-Derived Brominated Compound Aeroplysinin-1 Impairs the Endothelial Inflammatory Response through Inhibition of the NF-κB Pathway*. *Marine Drugs*, 20(10), 605.

Agradecimientos y financiación:

Financiado con los proyectos PID2019-105010RB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España), UMA18-FEDERJA-220 y P20_00257 (Junta de Andalucía-FEDER). Agradecimiento al Servicio de Cultivos Celulares de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga (SCAI-UMA).



Multilayer network approach to identify compensatory genes in rare diseases

Federico García Criado¹, Pedro Seoane Zonjic^{1,2,3} y Juan Antonio García Ranea^{1,2,3,4}

¹*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur, 31, Málaga, 29010, España.* ²*CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER-U741), Avda. Monforte de Lemos, 3-5, Pabellón 11, Planta 0, Madrid, 28029, España.* ³*Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA-Plataforma BIONAND), C/ Severo Ochoa, 35, Parque Tecnológico de Andalucía (PTA), Campanillas, Málaga, 29590, España.* ⁴*Instituto Nacional de Bioinformática (INB/ELIXIR-ES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), C/ Sinesio Delgado, 4, Madrid, 28029, España.*
E-mail: federogc98@uma.es

Clarifying relations between genetic and phenotypes processes is key for discovering therapeutic targets. A promising approach is to search for genes that could compensate the disruption/loss of function caused by alterations in other genes. However, finding these interacting pairs experimentally requires an immense gene screening effort. As a consequence, studies are mainly constrained to performing paralog comparisons (Ito et al., 2021) based on premature termination codon (PTC)-non sense decay (NMD), the only compensatory process currently characterized (El-Brolosy et al., 2019). There is a need for novel in-silico prioritization to identify additional candidates.

In this study we present a compensatory (backup) gene prioritization algorithm. It uses a multilayer network approach to overcome the complexity posed by the integration of different biological data. Based on a guilt-by-association hypothesis, compensatory genes are prioritized based on similarity at different biological levels, from molecular to phenotypic. The algorithm uses a multilayer similarity network built from multiple databases: Human Phenotype Ontology, Gene Ontology, HGNC Gene Family, Textmining and Coexpression String channels.

Due to limited information related to previous cases of gene compensation, we have divided the study into two stages, following a transfer learning approach. As first stage, a general gene functional similarity analysis performed across diseases using previous benchmarking strategies (Buphamalai et al., 2021; Zampieri et al., 2018). On second stage, to assess the specific identification of compensatory genes we used a gold standard based on the scientific literature. Results show that our state of the art gene disease prioritization algorithm presents high accuracy in compensatory gene prediction.



Referencias

- Buphamalai, P., Kokotovic, T., Nagy, V., & Menche, J. (2021). Network analysis reveals rare disease signatures across multiple levels of biological organization. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26674-1>
- El-Brolosy, M. A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G. L. M., Takacs, C. M., Lai, S.-L., Fukuda, R., Gerri, C., Giraldez, A. J., & Stainier, D. Y. R. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*, 568(7751), 193-197. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z>
- Ito, T., Young, M. J., Li, R., Jain, S., Wernitznig, A., Krill-Burger, J. M., Lemke, C. T., Monducci, D., Rodriguez, D. J., Chang, L., Dutta, S., Pal, D., Paoletta, B. R., Rothberg, M. V., Root, D. E., Johannessen, C. M., Parida, L., Getz, G., Vazquez, F., ... Sellers, W. R. (2021). Paralog knockout profiling identifies DUSP4 and DUSP6 as a digenic dependence in MAPK pathway-driven cancers. *Nature Genetics*, 53(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00967-z>
- Zampieri, G., Tran, D. V., Donini, M., Navarin, N., Aiolfi, F., Sperduti, A., & Valle, G. (2018). Scuba: Scalable kernel-based gene prioritization. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2025-5>

Agradecimientos y financiación

Este trabajo cuenta con el apoyo de fondos del Ministerio de Economía y Competitividad de España [PID2022-140047OB-C21]; el Instituto de Salud Carlos III (proyecto IMPaCT-Data, exp. IMP/00019), cofinanciado por la Unión Europea, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, “Una manera de hacer Europa”); y la Unión Europea a través del proyecto EURAS, Acuerdo de subvención nº: 101080580, Horizon Europe. CIBERER es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III. Federico García Criado cuenta con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU21/01449).



Cambios estacionales en la fotosíntesis y composición bioquímica en macroalgas árticas

Cobos Pablo^{1*}, Raquel Carmona¹, Concepción Iñiguez¹, Carlos Smerdou¹ Elisa Gordo², Sergio Cañete², Manuel Macias¹ and Francisco J. L. Gordillo¹

¹*Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.*

²*Servicios centrales de atención a la investigación (SCAI), Universidad de Málaga.*


E-mail: pablocobosmateo@uma.es

El aumento de temperatura en el Ártico tiene consecuencias en la fisiología de algas formadoras de bosques marinos, cuya dinámica estacional se desconoce. En este estudio, se ha caracterizado la respuesta fotosintética (mediante fluorescencia de la clorofila a, evolución de O₂ y fijación de ¹⁴C) y la composición bioquímica (pigmentos, carbohidratos solubles, proteínas solubles, lípidos y C y N totales) de cinco especies comunes de Kongsfjorden (Svalbard), entre otoño de 2016, primavera y finales de verano de 2017 y verano de 2019. Las especies fueron las ocrófitas *Saccharina latissima* y *Alaria esculenta*, las rodófitas *Phycodrys rubens* y *Ptilota gunneri*, y la clorófito *Monostroma aff. arcticum*. La variación de la fluorescencia de la clorofila a confirmó que en verano las algas pardas y verdes presentan una mayor sensibilidad a la irradiación continua que las rodófitas. La evolución del O₂ constató que las pardas tuvieron un mayor rendimiento fotosintético en marzo, mientras que las especies rojas y verdes lo tuvieron en septiembre. La pérdida general de capacidad fotosintética medida con ¹⁴C en verano vino acompañada por la disminución de la concentración de pigmentos. El alto contenido en N en marzo y el alto contenido en C en agosto revelan un patrón en la composición elemental, relacionado con la disponibilidad estacional de nutrientes y luz.

Financiación:

Becas para el desarrollo de la tesis doctoral de la fundación Ramón Areces (01/04/2023 – 15/01/2023)

Beca FPU (15/01/2023 – Actual)



Empleo de una dieta con cacao rico en compuestos fenólicos para potenciar la función cognitiva y la neurogénesis hipocampal adulta en ratones

Sonia^{1,2,4} Melgar-Locatelli^{1,2,4} , María del Carmen^{1,2,7} Mañas-Padilla^{1,2,7} , Adriana^{1,2} Castro-Zavala^{1,2} , María del Carmen^{4,5} Razola-Díaz^{4,5} , Lidia² Medina Rodríguez² Patricia^{1,3} Rivera^{1,3} , Celia^{4,5,6} Rodríguez-Pérez^{4,5,6} , Estela^{1,2} Castilla-Ortega^{1,2}

¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND. ²Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Universidad de Málaga. ³Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga. ⁴Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja. ⁵Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos 'José Mataix' (INYTA), Universidad de Granada. ⁶Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA). ⁷Universidad Internacional de la Rioja (UNIR).

E-mail: soniaml1998@uma.es

El consumo de cacao se ha relacionado durante mucho tiempo con una multitud de beneficios para la salud debido a su rica combinación de minerales, fibra, metilxantinas y polifenoles, especialmente flavanoles (De Arujo et al. 2016, Cory et al. 2018). A pesar de ello, los efectos cognitivos del cacao han sido escasamente investigados. Con el fin de profundizar en el impacto del cacao en la plasticidad sináptica, la función cognitiva y el comportamiento emocional, se realizó un estudio utilizando ratones C57BL/6JRj de ambos sexos, alimentados con una dieta estándar o una dieta enriquecida con un 10% de cacao con alto contenido fenólico (HPC) o cacao con bajo contenido fenólico (LPC). Se llevaron a cabo una serie de pruebas de comportamiento animal para evaluar la exploración y el comportamiento emocional, así como la memoria dependiente del hipocampo. La plasticidad sináptica fue estudiada mediante inmunohistoquímica, para evaluar la neurogénesis hipocampal adulta (NHA), y western blot, para analizar la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Los resultados destacaron que únicamente la dieta HPC mejoró la memoria de reconocimiento de objetos y aumentó la NHA. Sin embargo, ambas dietas enriquecidas con cacao incrementaron la inmovilidad en la prueba de natación forzada y la expresión de BDNF en el hipocampo. No se observaron diferencias de sexo. En general, la dieta enriquecida con cacao HPC demostró un mayor potencial en cuanto a beneficios cognitivos y neuroplásticos, lo que sugiere un papel clave de los flavanoles del cacao en intervenciones dietéticas destinadas a mejorar la salud cerebral.



Referencias

- H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez and J. Mattei, *The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review*, *Frontiers in nutrition*, 2018, 5, 87.
- Q. R. De Araujo, J. N. Gattward, S. Almoosawi, M. Silva, P. A. Dantas and Q. R. De Araujo Júnior, *Cocoa and Human Health: From Head to Foot--A Review*, *Critical reviews in food science and nutrition*, 2016, 56, 1-12.

Financiación

Project PID2020-114374RB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and Junta de Andalucía-Consejería de Universidad, Investigación e Innovación—Proyect P21_00777.



D-chiro-inositol ameliorates insulin resistance and glutamate receptors dysregulation in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease.

Beatriz Pacheco Sánchez^{1,2,3}, Juan Antonio Navarro^{1,2,4}, Margarita Pérez Martín³, Patricia Rivera González^{1,2}, Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,2}.

¹ Instituto de investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, 29010 Málaga, Spain. ² UGC Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29010 Málaga, Spain. ³ Universidad de Málaga, Andalucía Tech, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain. ⁴ Universidad de Málaga, Andalucía Tech, Facultad de Medicina, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

E-mail: bea.pacsan@uma.es

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia among older adults, is characterized by significant cognitive and neuropathological changes. Sporadic AD has been proposed to be associated with alterations on insulin signaling (Ma, Q. L., *et al.*, 2009) and increased neuronal vulnerability to glutamate-induced excitotoxicity (Tanovic, A., & Alfaro, V., 2006), both of which have been linked to neural loss and impaired cognition.

The present study describes the effect of oral dietary administration of D-chiro-inositol (DCI), an insulinmimetic inositol used against insulin resistance, on glutamate receptor dysregulation and the cognitive impairment of 3xTg-AD mice. This so called "triple- transgenic mice" model mimics many critical aspects of AD neuropathology. To this end, we analysed the effects of daily oral administration DCI 200 mg/kg/day, for 3 months from 3 months of age, in male and female 3xTg and WT mice. We performed qPCR and Western blot analysis in hippocampal samples, in order to evaluate the interaction of glutamatergic and insulin pathways in the pathogenesis of AD.

Our results showed that the protein expression of the glutamatergic receptors in the hippocampus is higher in the 3xTg-vehicle group compared to WT-vehicle group. After DCI treatment, some of these alterations were reversed, with a decrease of NMDAR2B and mGluR5 expression in 3xTg-DCI mice. Two-way ANOVA also showed an effect of the genotype and treatment in insulin receptors gene expression (*Insr*, *Irs1* and *Igf1r*), as well as in PI3K/Akt. In conclusion, our study suggests that DCI reduces insulin resistance, and partially restore glutamatergic transmission, a profile compatible with reduced vulnerability to rapid cognitive decline.

References:

Ma, Q. L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., ... & Cole, G. M. (2009). β -amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9078-9089.



Tanovic, A., & Alfaro, V. (2006). Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. Rev Neurol, 42(10), 607-616.

Acknowledgements:

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project "DTS22/00021" and co-funded by the European Union.



DEPTOR promotes bone marrow adipose tissue expansion in calorie restricted mice

Jesús Arcedo¹, Iván Duran¹, Fabiana Csukasi¹.

¹Department of Cell Biology, Genetics and Physiology-Laboratory of Skeletal Biomedicine, IBIMA Plataforma BIONAND, University of Malaga.

E-mail: jesusarcra@uma.es

Elevated levels of fat in bones is a characteristic feature of osteoporosis and other skeletal disorders (Yeung et al., 2005). Understanding the preference for adipose differentiation over osteogenesis is key to addressing the rising prevalence of bone fragility in our aging population. While the molecular mechanism behind this shift between bone and fat formation remains incompletely understood, it is evident that the alteration of skeletal stem cell (SSC) differentiation likely plays a pivotal role. In particular, cellular metabolism is critical for SSC maintenance and lineage allocation (van Gestel & Carmeliet, 2021). Interestingly, both osteoporosis and dietary restrictions lead to similar increased fat/bone ratio (Bredella et al., 2009; Devlin et al., 2010). Recently, we showed high levels of DEPTOR, an mTOR inhibitor and therefore a metabolic regulator, in several skeletal dysplasias with altered differentiation of skeletal progenitors (Csukasi et al., 2018, 2023). Here, we elucidate the role of DEPTOR in the increase in bone marrow adipose tissue (BMAT) under restricted nutrition. WT mice subjected to a 30% caloric restriction showed decreased trabecular bone and increased BMAT whereas *DEPTOR* KO mice exhibited little to none BMAT increase and even higher trabecular bone parameters compared to WT in response to caloric restriction. Proteomic analysis from bone marrow revealed 1110 upregulated and 478 downregulated proteins under caloric restriction in WT mice. Interestingly, in calorie restricted *DEPTOR* KO mice, more than half of these proteins reverted to levels similar to those observed in WT controls. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis showed that these proteins contribute to several processes related to lipids such as fatty acid biosynthesis, elongation, and metabolism. These results point to DEPTOR as a key regulator in the metabolic control of skeletal progenitors' differentiation under specific nutritional status. They also provide the rationale for its study as a pathological marker of abnormal bone/fat balance and as a potential target for the treatment of different low bone mass pathologies.

Referencias

- Bredella, M. A., Fazeli, P. K., Miller, K. K., Misra, M., Torriani, M., Thomas, B. J., Ghomi, R. H., Rosen, C. J., & Klibanski, A. (2009). Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(6), 2129–2136. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2532>
- Csukasi, F., Bosakova, M., Barta, T., Martin, J. H., Arcedo, J., Barad, M., Rico-Llanos, G. A., Zieba, J., Becerra, J., Krejci, P., Duran, I., & Krakow, D. (2023). Skeletal diseases caused by mutations in *PTH1R* show aberrant differentiation of skeletal progenitors due to dysregulation of DEPTOR. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.963389>



- Csukasi, F., Duran, I., Barad, M., Barta, T., Gudernova, I., Trantirek, L., Martin, J. H., Kuo, C. Y., Woods, J., Lee, H., Cohn, D. H., Krejci, P., & Krakow, D. (2018). The PTH/PTHrP-SIK3 pathway affects skeletogenesis through altered mTOR signaling. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 10). <http://stm.sciencemag.org/>
- Devlin, M. J., Cloutier, A. M., Thomas, N. A., Panus, D. A., Lotinun, S., Pinz, I., Baron, R., Rosen, C. J., & Bouxsein, M. L. (2010). Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(9), 2078–2088. <https://doi.org/10.1002/jbmr.82>
- van Gastel, N., & Carmeliet, G. (2021). Metabolic regulation of skeletal cell fate and function in physiology and disease. *Nature Metabolism*, 3(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00321-3>
- Yeung, D. K. W., Griffith, J. F., Antonio, G. E., Lee, F. K. H., Woo, J., & Leung, P. C. (2005). Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: A proton MR spectroscopy study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 22(2), 279–285. <https://doi.org/10.1002/jmri.20367>

Agradecimientos y financiación.

Ministerio de Ciencia e Innovación: PCI2021-122094-2B.

Junta de Andalucía: EMC_00141, PROYEXCEL_00433.

Consejería de salud y familias: PIGE-0178-2020.

Agencia estatal de investigación: PID2020-117255RB-100.



Development of a Novel Bone Model: Hydrogel-DBM Combination

Sandra Escalante Quirós^{1,2}, Jennifer Rojas Perez², Fabiana Csukasi^{1,2}, Iván Durán^{1,2}

¹*Laboratorio de Biomedicina Esquelética. Ibima-Plataforma Bionand, Málaga*

²*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Universidad de Málaga.*

Decellularized bone matrix (DBM) is a classic approach in the generation of bone organoids since it provides a native microenvironment suitable for osteogenic development (Chen et al., 2017). However, this approach has not allowed to obtain an experimentally reproducible bone organoid that sufficiently replicates the biology of bone. Studies conducted by Gan et al., 2023 demonstrated that the use of functionalized hydrogels as a three-dimensional form to culture stem cells promotes differentiation and thus the osteogenic capacity of the organoid. The objective of this work is to develop an organoid based on the combination of hydrogels and DBMs to efficiently reproduce bone biology.

We tested PVA and dextrans hydrogels in combination with BMP responsive reporter cell line (BRITER) and the long-term effect of the RGD peptide addition to hydrogels evaluating osteogenic differentiation by alkaline phosphatase method. We analyze by histology and luciferase assays different approaches to combine decellularized DBMs with a variety of hydrogels containing BRITER cells and differentiated them under osteogenic conditions for 3 weeks. Furthermore, the functionalization of these hydrogels with a protein with morphogenetic potential such as laminin was verified.

Cells cultured in dextran hydrogels showed a three-dimensional distribution, unlike PVA, in addition to gelation time more suitable for introducing them into DBMs. Functionalization with RGD peptides positively influenced osteogenic differentiation, moreover, the addition of laminin to the hydrogel enhanced this response. Regarding DBMs, decellularization with SDS detergent showed a more effective removal of cellular debris without compromising tissue integrity. Preliminary results of dextran hydrogels and DBMs combination showed indicative of osseointegration and osteogenic differentiation. Combination of DBM and RGD functionalized dextran hydrogel provides three dimensionality and promote bone differentiation, constituting a promising strategy to develop more suitable models for reproducing bone native conditions.

Referencias

Chen, G., & Lv, Y. (2017). Decellularized bone matrix scaffold for bone regeneration. *En Methods in molecular biology* (pp. 239-254).



Gan, Z., Qin, X., Liu, H., Liu, J., & Qin, J. (2023). *Recent advances in defined hydrogels in organoid research. Bioactive Materials, 28, 386-401.*

Agradecimientos y financiación

Plan nacional VASCUBONE: PID2020-117255RB-100; and Proyecto excelencia Junta de Andalucía P21-0034.

Plan Propio Universidad de Málaga.



Exploring the role of extracellular vesicles in geminiviral infection

Pablo Morales-Martínez¹, Pepe Cana-Quijada¹, Tábata Rosas-Díaz¹, Benjamin L. Koch², M. Lucía Borniego², Meenu Singla-Rastogi², Rosa Lozano-Durán³, Roger W. Innes², Eduardo R Bejarano¹ and Araceli G Castillo¹

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología. Málaga, Spain.* ²*Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN, USA.* ³*Department of Plant Biochemistry, Center for Plant Molecular Biology (ZMBP), Eberhard Karls University, Tübingen, Germany.*
E-mail: pablomoralessmar@uma.es

Geminiviruses constitute the main family of DNA viruses in plants worldwide and pose a severe threat to agronomically relevant crops such as tomato, cotton, and maize in tropical and subtropical regions. Due to the few proteins encoded by their viral genome (from 6 to 9), geminiviruses rely heavily on host cellular machinery and co-opt multiple biological processes to complete all the processes required for infection, such as viral replication, movement and suppression or evasion of plant defense mechanisms (Yan et al., 2021). While geminiviruses are known to move from cell to cell through plasmodesmata (Breves et al., 2023; Hanley-Bowdoin et al., 2013), we lack a clear understanding of how these viruses spread systemically in the plant. Our group has recently detected, amplified, and sequenced viral DNA sequences present in the apoplast of infected plants. This suggests that geminiviruses might be transported long distances using an extracellular route.

We hypothesize that extracellular transport of geminiviruses may be mediated by extracellular vesicles (EVs), which are membrane-bound structures secreted to the extracellular space to potentially mediate several plant-pathogen interactions such as cross-kingdom RNA interference or the delivery of stress response proteins (Borniego & Innes, 2023; Rutter & Innes, 2017). In animals, EVs facilitate viral transmission both within the host and even across species (Kerviel et al., 2021) though in plants, viral transmission inside EVs has only been observed for one RNA virus, *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Movahed et al., 2019).

In this work, we aimed to determine the presence of complete viral genomes and apoplastic viral particles associated with EVs through DNA amplification, proteomics, and electron microscopy, and characterize the putative secretion of viral RNAs to the apoplast upon infection.

References

1. M. L. Borniego, R.W. Innes. *Journal of experimental botany*. **74** 2389–2404 (2023).
2. S.S. Breves, F.A. Silva, N.C. Euclides, T.F.F. Saia et al. *Viruses*. **15**, 1593 (2023).
3. L. Hanley-Bowdoin, E. R. Bejarano et al. *Nature Reviews. Microbiology*. **11**, 777-788
4. A. Kerviel, M. Zhang, N. Altan-Bonnet. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **37**, 171–197 (2021).



5. N. Movahed, D.G. Cabanillas, J. Wan et al. *Plant physiology*. **180**, 1375–1388 (2019).
6. B.D. Rutter, R.W. Innes. *Current opinion in plant biology*, **44**, 16–22 (2018).
7. Z. Yan, A. M. A. Wolters, J. Navas-Castillo, Y. Bai. *Microorganisms*. **9**, 1–19 (2021).

Acknowledgements and funding.

The authors would like to thank Adela Zumaquero and Victoria Motos for technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF) (grant PID2019-107657RB-C22 to E.R.B and A.G.C.) and by the Spanish Ministerio de Universidades (fellowship number FPU20/0375 to P.M.M.).



Phenotypic and Metabolomic Responses of *Fragaria vesca* to Varied Environmental Conditions: Insights from the PlantCline Project

José E Pérez-Martín¹, Femke Batsleer², Dries Bonte², Ivan M. De-La-Cruz³, Carolina Diller³, Anne Muola^{4,5}, Martijn L. Vandegehuchte⁶, Johan Stenberg³, José F Sánchez-Sevilla^{7,8}, Timo Hytönen⁹, Sonia Osorio^{1,8}, David Posé^{1,8}.

¹*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Málaga, Spain.* ²*Terrestrial Ecology Unit (TEREC). Department of Biology, Ghent University, Ghent, Belgium.* ³*Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden.* ⁴*Department of Biology, University of Turku, 20014 Turku, Finland.* ⁵*Division of Biotechnology and Plant Health, Norwegian Institute of Bioeconomy Research, 9016 Tromsø, Norway.* ⁶*Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway.* ⁷*Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA). Unidad* ⁸*Asociada al CSIC de I+D+i Biotecnología y Mejora en Fresa, Junta de Andalucía, Málaga, Spain.* ⁹*Faculty of Agriculture and Forestry. Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland.*

E-mail: jepm@uma.es

Climate change poses a significant threat to plant species, potentially altering their distribution and physiological processes. The European project PlantCline seeks to understand these impacts through a collaborative scientific effort to enhance our knowledge about plant resilience and adaptation, focusing on the model organism *Fragaria vesca*. This abstract outlines a comprehensive study of 16 *F. vesca* genotypes, strategically selected to represent a significant sampling of latitudinal gradients across Europe. Grown in various common gardens throughout the continent, these plants were exposed to differing environmental conditions and a controlled drought scenario, offering the possibility of additional comparisons. Phenotypic measurements were taken from these plants, and leaf samples were harvested to analyse primary metabolites using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry technique (GC-MS). The data derived from this study aims to determine the genotypes' capacity to respond to environmental changes, thereby providing insights into their potential plasticity in the face of climatic shifts.

Preliminary results indicate that the different genotypes exhibit varying degrees of response to environmental changes, suggesting diverse levels of phenotypic plasticity. These findings have profound implications for understanding how plant species may cope with the ongoing challenges imposed by climate change. They also offer valuable information for conservation strategies and agricultural practices, as identifying genotypes with higher plasticity could inform the selection of species more likely to thrive in changing climates.



Acknowledgments: This work has been funded by the European project PlantCline (ref. PCI2020-120719-1), Ayuda D2 Plan Propio by Universidad de Málaga and Proyecto QUAL21 012 IHSM (Consejería de Universidad, Investigación e Innovación, Junta de Andalucía).



Diferencias sexuales en la neurogénesis hipocampal adulta de ratones expuestos a estrés durante el periodo postnatal.

Jose Munoz-Martin^{1,2}, Patricia Chaves-Peña¹, María Inmaculada Infantes-López^{1,2}, Emma Zambrana-Infantes³, Andrea Nieto-Quero³, Virginia Carayol-Gordillo¹, Víctor Martín-Aguilar³, Alejandro Zea-Dona¹, Carmen Pedraza^{2,3},
Margarita Pérez-Martín^{1,2}.

¹*Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología - Área de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.* ²*Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, IBIMA – Plataforma BIONAND.* ³*Departamento de Psicobiología y Metodologías de las Ciencias del Comportamiento – Área de Psicobiología, Facultad de Psicología y Logopedia, Universidad de Málaga.*

E-mail: jmunozma@uma.es ; marper@uma.es

Introducción: El estrés en la infancia puede producir cambios cerebrales y aumentar la vulnerabilidad a los trastornos relacionados con el estrés en la edad adulta. El proceso de neurogénesis hipocampal adulta podría ser un mecanismo neurobiológico subyacente a esta susceptibilidad y sujeto a posibles cambios en función del sexo.

Objetivos: Caracterizar el impacto del estrés temprano sobre la respuesta neurogénica adulta de ratones machos y hembras, analizando las células granulares DCX+ del giro dentado (DG).

Métodos: Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa C57BL/6J que fueron sometidos a un protocolo de separación maternal (MS) como estresor temprano. En la etapa adulta los ratones fueron sometidos a un evento de estrés por restricción (RS). Los grupos experimentales fueron los siguientes: CTRL, RS, MS, MS+RS. Se identificaron las células DCX+ en el DG y se cuantificaron mediante estereología, obteniendo las densidades y porcentajes celulares según la morfología celular de maduración (Tipo A: células DCX+ redondas sin prolongaciones, Tipo B: células DCX+ con una prolongación dendrítica, Tipo C: células DCX+ con ramificaciones dendríticas).

Resultados: Se encontraron diferencias sexuales en los animales que recibieron ambos estresores (MS+RS), observando una mayor densidad de células DCX+ (Tipo C) en el caso de las hembras pero ninguna alteración en los machos. En hembras, este cambio era específico del DG ventral pero no del DG dorsal. En cuanto a los porcentajes de células DCX+ según la morfología, se observó un aumento del porcentaje de células Tipo C (mayor madurez) y una disminución del porcentaje de células Tipo A (menor madurez). En el DG ventral, se observó



una diferencia entre los grupos de hembras y machos con separación maternal (MS), pero no con sus respectivos controles, lo que significaría una posible diferencia sexual inducida por la separación maternal.

Conclusiones: Estos resultados revelan una respuesta neurogénica diferencial al estrés en función del sexo y abren la puerta a una mejor comprensión de las bases neurobiológicas de trastornos relacionados con el estrés como la depresión.

Agradecimientos y Financiación

Agradecimientos a la Universidad de Málaga. Esta investigación ha sido financiada por los proyectos: PID2020-117464RB-I00 del MCIN/AEI/10.13039/501100011033 a Pedraza, C. y Pérez-Martín, M. El proyecto P20_00460 de la Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidades, Junta de Andalucía concedido a Pedraza, C. El proyecto UMA20-FEDERJA-112 de FEDER/Junta de Andalucía—Proyectos I + D + I en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020 concedido a Pedraza, C. y Pérez-Martín, M. La financiación de Muñoz-Martín J. proviene de los contratos predoctorales del I Plan Propio de Investigación, Transferencia y Divulgación Científica (convocatoria 2021) de la Universidad de Málaga y del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU21/01318) del Ministerio de Universidades.



Targeting metabolism to impair tumor lymphangiogenesis

Nieves Montenegro-Navarro^{1,2}, Estefanía Díaz del Cerro^{1,2}, Claudia García-Báez^{1,2}, Melissa García-Caballero^{1,2}.

¹Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga (Málaga, Spain). ²IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga)-BIONAND platform, University of Málaga (Málaga, Spain).

E-mail: nievesmn@uma.es

Lymphangiogenesis, the generation of new lymphatic vessel from pre-existing ones, contributes to cancer progression and metastasis. Targeting the metabolism of lymphatic endothelial cells (LEC) has emerged as a promising strategy to block lymphangiogenesis and hinder cancer progression. Through a comprehensive meta-analysis of breast cancer single cell RNA-sequencing datasets encompassing both normal and tumor-associated LECs, upregulated genes were identified in the latter. This finding was validated through *in vitro* experiments involving direct and indirect coculture of LECs with different cancer cell lines. We further silenced different genes in LECs and studied their functional effects. Cell viability, proliferation, migration, invasion, spheroid sprouting and tube formation were affected by the absence of these genes. Moreover, analysis of the redox balance revealed higher levels of oxidative stress and lower antioxidant power upon gene silencing. Besides, mitochondrial reactive oxygen species were elevated, accompanied by increased mitochondrial fragmentation. In this context, analysis of oxygen consumption rates revealed that silenced LECs had lower glycolytic rates but increased ATP production. To substantiate the relevance of these metabolic genes *in vivo*, the murine fat pad model was performed, and tumor growth and metastasis were evaluated. Collectively, our findings show that LEC metabolism is as a promising target to be harnessed for preventing cancer progression and metastasis.



Uso del test de activación de basófilos como herramienta de predicción de una respuesta eficaz a la inmunoterapia sublingual con Pru p 3 en la alergia a la proteína de transferencia lipídica

María del Carmen Martín-Astorga^{1,2}, Anyith Cruz-Amaya¹, Clara Lebrón-Martín¹, Ana Molina¹, Natalia Pérez-Sánchez², Francisca Gómez², María José Torres^{1,2,3}, José Antonio Cañas¹, Cristobalina Mayorga^{1,3}.

¹Grupo de Enfermedades Alérgicas a Fármacos y Alérgenos, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA-Plataforma BIONAND), Málaga, España.

²Universidad de Málaga (UMA), Málaga, España.

³UGC de Alergología, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, España.

Email: mcmartin@uma.es

Introducción: La alergia alimentaria (FA) a proteínas no específicas de transferencia lipídica (nsLTPs), como Pru p 3, puede desencadenar reacciones graves. La inmunoterapia específica con alérgenos es una opción de tratamiento eficaz, especialmente la inmunoterapia sublingual (SLIT) con Pru p 3 [1]. Sin embargo, en algunos pacientes no es efectiva. Por lo tanto, se necesita una herramienta eficaz para predecir la respuesta de tolerancia a la inmunoterapia. En este contexto, el test de activación de basófilos (BAT) ha surgido como un método *in vitro* útil en el diagnóstico de la FA [2,3]. Por lo tanto, nuestro objetivo fue establecer el uso potencial de la BAT para evaluar la eficacia de la SLIT en pacientes alérgicos a Pru p 3.

Métodos: Se reclutaron 11 pacientes con alergia a nsLTP y 16 sujetos sanos. Los pacientes fueron tratados con Pru p 3-SLIT diariamente, o con placebo. Se recogieron muestras de sangre al inicio del estudio (T1) y al cabo de un año del inicio del tratamiento (T2). El BAT se realizó en sangre total utilizando Pru p 3 con siete concentraciones (0,1-0,000001 µg/ml), y la reactividad de los basófilos se analizó mediante citometría de flujo con el porcentaje de células CD63+. Además, se determinaron los niveles séricos de IgE específica (sIgE) a Pru p 3 mediante ImmunoCAP (ThermoFisher). Se emplearon curvas dosis-respuesta y curvas ROC para determinar el punto de corte óptimo. Además, se evaluaron la sensibilidad umbral al alérgeno de los basófilos (CD-Sens) y el área bajo la curva dosis-respuesta (AUC) como otros parámetros derivados del BAT.

Resultados: Tras la realización del BAT, las curvas dosis-respuesta mostraron que los pacientes alérgicos presentaban un porcentaje de CD63+ significativamente más alto que los controles al inicio del tratamiento. Las curvas ROC mostraron valores elevados de sensibilidad (<90%) y especificidad (>87,5%), y se estableció un punto de corte óptimo que mostraba una positividad



del 100%. Las comparaciones del porcentaje de CD63+, AUC, CD-Sens y sIgE mostraron niveles similares en los pacientes tratados con Pru p 3-SLIT o con placebo en los diferentes puntos temporales (T1 y T2). No obstante, y curiosamente, el valor del porcentaje de CD63+ fue significativamente inferior en los pacientes tolerantes tras la SLIT a la concentración de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ de Pru p 3, a diferencia de los niveles de sIgE, que permanecieron inalterados tras el tratamiento.

Conclusiones: El BAT no sólo es una herramienta diagnóstica precisa en pacientes alérgicos a nsLTP sino también una técnica útil para predecir la respuesta a la tolerancia en pacientes tratados con Pru p 3-SLIT frente a otras técnicas rutinarias como la determinación de la IgE.

Nº Sujetos	Edad	Sexo	Reacción	Tratamiento
LTP-1	27	Femenino	ANAFILAXIA	ACTIVO
LTP-2	48	Femenino	ANAFILAXIA	ACTIVO
LTP-3	37	Femenino	SÍNDROME DE ALERGIA ORAL	PLACEBO
LTP-4	30	Masculino	URTICARIA	ACTIVO
LTP-5	45	Femenino	ANAFILAXIA	PLACEBO
LTP-6	38	Femenino	ANAFILAXIA	PLACEBO
LTP-7	30	Femenino	SÍNDROME DE ALERGIA ORAL	PLACEBO
LTP-8	29	Femenino	SÍNDROME DE ALERGIA ORAL	ACTIVO
LTP-9	45	Femenino	ANAFILAXIA	ACTIVO
LTP-10	27	Femenino	URTICARIA	PLACEBO
LTP-11	29	Femenino	ANAFILAXIA	ACTIVO

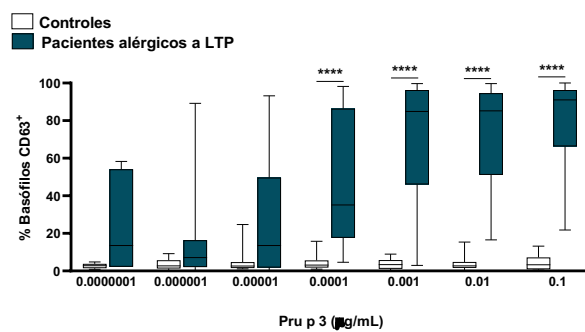


Figura 1: Características clínicas de los sujetos y curvas dosis-respuesta del BAT. Los pacientes alérgicos presentaban un porcentaje de CD63+ significativamente más alto que los controles al inicio del tratamiento.

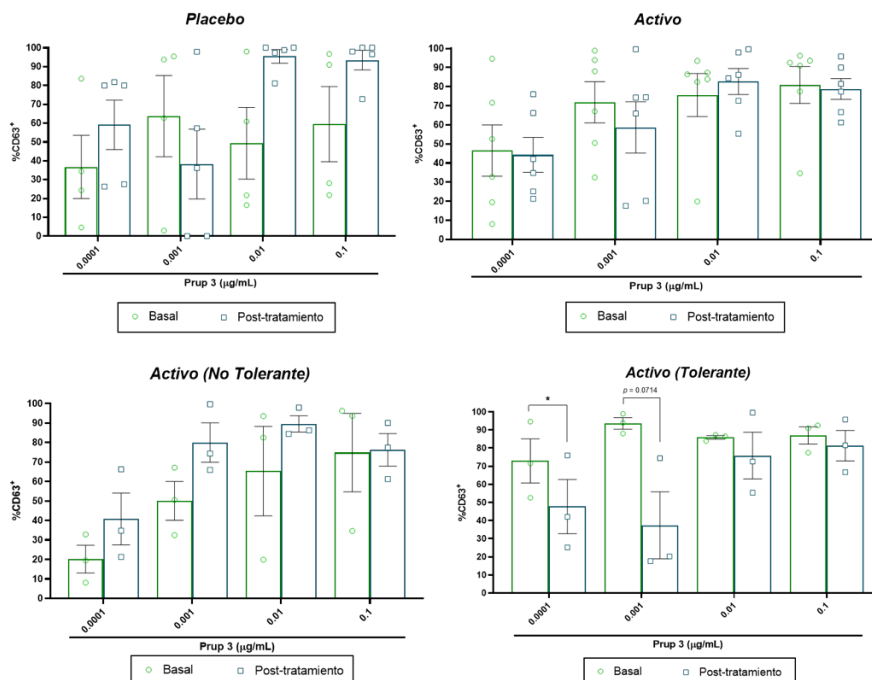


Figura 2: Comparativa del BAT antes y después del tratamiento. El porcentaje de CD63+ fue significativamente inferior en los pacientes tolerantes tras la SLIT a la concentración de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ de Pru p 3.



Referencias:

1. Palomares F, Gomez F, Bogas G, Campo P, Perkins JR, Diaz-Perales A, Rodriguez MJ, Prieto A, Barber D, Torres MJ, Mayorga C. Immunological Changes Induced in Peach Allergy Patients with Systemic Reactions by Pru p 3 Sublingual Immunotherapy. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Feb;62(3). doi: 10.1002/mnfr.201700669. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29105313.
2. Céspedes JA, Lebrón-Martín C, García-Otón R, Delgado MJ, Martín-Astorga MDC, Pérez-Sánchez N, Gómez F, Torres MJ, Cañas JA, Aranda CJ, Mayorga C. In vitro supporting diagnostic tools in plant-food allergy. *Allergy*. 2023 Sep;78(9):2540-2543. doi: 10.1111/all.15737. Epub 2023 Apr 16. PMID: 37026176.
3. Cañas JA, Pérez-Sánchez N, Lopera-Doblas L, Palomares F, Molina A, Bartra J, Torres MJ, Gómez F, Mayorga C. Basophil Activation Test Utility as a Diagnostic Tool in LTP Allergy. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 29;23(9):4979. doi: 10.3390/ijms23094979. PMID: 35563370; PMCID: PMC9105056.

Financiación: Este trabajo ha contado con la financiación del Instituto de Salud "Carlos III" (ISCIII) del Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos "PI17/01318", "PI18/00288", y "AC18/00031" cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa", "Andalucía se mueve con Europa", y los proyectos "PI21/00346" y "PI21/01391" cofinanciados por la Unión Europea; RETICS ARADyAL (RD16/0006/ 0001), Ayudas Predoctorales de Formación en Investigación Sanitaria (FI22/00106, FI22/00199 y FI23/00027), Sara Borrell (CD20/00085 y CD21/00034); Horizon Europe Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) Postdoctoral Fellowships 2022 (HORIZON-MSCA-2022-PF-01-01 MSCA); RICORS (RD21/0002/0008); Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PE-0039-2018), y Programa Nicolas Monardes (RC0004-2021).